



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

생활과학석사학위논문

유지의 산패도가 유지 가열 후
다환방향족탄화수소 생성에 미치는 영향

**The Influence of Lipid Rancidity on the Formation
of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Heated Oils
and Their Fumes**

2016년 8월

서울대학교 대학원

식품영양학과

김 찬 미

국문초록

다환방향족탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs)는 2개 이상의 벤젠고리가 융합된 화합물으로써, 화학연료나 유기물의 불완전 연소 시 부산물로 발생하는 물질이다. 식품에서는 음식을 조리, 가공할 때 탄수화물, 지방, 단백질 등의 유기물이 분해되어 생성된다. PAHs는 특히 친유성(lipophilicity)이 강하여, 조리된 식품에서는 지질과 같은 매질에서 다량 발견될 수 있다. 그리고 기름을 가열하는 등의 조리 방법은 일상에서 자주 사용되기 때문에, 식용유지류 가열 시 PAHs 생성량을 줄이기 위해서는 어떤 요인이 식용유지의 PAHs 생성량에 영향을 미치는지 알아볼 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 유지의 산패도가 유지 가열 후 PAHs 생성량에 미치는 영향에 대해 분석하였다.

같은 회사에서 제조된 정제유 7종을 시중에서 구입하여 자외선, 공기, 철에 각각 2주, 4주, 8주 동안 노출시켜 시료를 준비하였다. 그리고 이러한 식용유지와 synthetic triglyceride 각각을 시험관에 담아 200℃에서 6시간 가열하였는데, 이때 시험관을 PTFE filter를 장착한 cap으로 밀봉하여 fume에서 생성되는 PAHs를 포집할 수 있도록 하였다. 그리고 가열 후 oil과 fume 각각의 PAHs 생성량을 측정함으로써 식용유지 가열 시 발생할 수 있는 모든 PAHs 생성량을 고려하였다. PAHs의 정량은 gas chromatography/mass spectroscopy (GC/MS) 기기를 사용하였으며, 본 연구에서는 6종의 PAHs 즉, benzo[a]anthracene(BaA), chrysene(CHR), benzo[b]fluoranthene(BbF), benzo[a]pyrene(BaP), indeno[1,2,3-c,d]pyrene(IP), dibenzo[a,h]anthracene(DBahA)을 분석대상물질로 선정하였다.

유지의 산패도는 가열 전, 후 산화기간에 따라 과산화물가, thiobarbituric acid test, p-anisidine value, 산가를 측정하였고, 불포화도는 구입한 그대로의 식용유지에 대해 요오드가를 측정하였다.

유지 산패도와 PAHs간 상관분석과 회귀분석은 통계분석에 적절하지 않은 검출수를 나타낸 PAHs 화합물 4종을 제외하고, BaA, DBahA와 Σ 6PAHs(PAHs 6종의 합)에 대해서만 수행하였다. 그 결과, 각 산패 지표와 PAHs 관계 중 유의성을 나타낸 모든 결과에서 음의 선형관계를 보였다. 즉, 산패 지표가 증가할수록 가열 후 PAHs 생성이 감소하는 결과를 얻게 되었다.

그러나 이들 산패 지표가 PAHs 생성에 영향을 미치는 유일한 요인은 아닌 것으로 사료된다. 이에 대해 유지 종류별로 PAHs 생성량의 차이를 확인한 결과, 발연점이 낮은 유지의 경우 가열 후 PAHs 생성량이 높은 것을 알 수 있었다. 또한 유지 산화로 인해 생성된 breakdown products 중 산소를 포함하지 않는 hydrocarbons 등이 유지 가열 후 PAHs 생성에 기여했을 가능성을 고려할 수 있다. hydrocarbons는 PAHs 전구체 생성에 기여할 수 있을 뿐 아니라 산소를 포함한 같은 구조의 화합물보다 발연점이 낮다고 알려져 있기 때문에, 유지의 산패 지표로써 hydrocarbons를 측정하는 등의 추가적인 후속 연구가 필요할 것으로 보인다. 그리고 식용유지 내 주로 존재하는 fatty acids 4종의 순수한 triglyceride 형태를 가열했을 때에 PAHs가 거의 검출되지 않아 불포화도에 따른 PAHs 생성량의 차이는 확인할 수 없었다.

.....

주요어 : 다환방향족탄화수소, triglyceride, 식용유지, 산패도, 발연점, 분석법.

목 차

국문초록	i
목차	iii
List of Tables	v
List of Figures	vi
1. 서론	1
2. 문헌고찰	
2.1. 다환방향족탄화수소의 특성	3
2.2. 다환방향족탄화수소의 노출원 및 발암기작	6
2.3. 식용유지 내 다환방향족탄화수소 함량 및 국가규제	9
2.4. 다환방향족탄화수소 분석법	10
2.5. 유지의 불포화도와 산패도	11
3. 재료 및 방법	
3.1. 시료 준비	13
3.2. 유지의 불포화도와 산패도 측정	15
3.2.1. 시약 및 기기	15
3.2.2. 요오드가	17
3.2.3. 과산화물가	18
3.2.4. Thiobarbituric acid value	19
3.2.5. p-Anisidine value	19
3.2.6. 산가	20
3.3. 유지의 다환방향족탄화수소 분석	21
3.3.1. 다환방향족탄화수소 분석대상	21
3.3.2. 시약 및 기기	23
3.3.3. 시료 전처리	25
3.3.4. 기기분석	26
3.3.5. 분석법 검증	28
3.4. 통계처리	29

4. 결과 및 고찰	
4.1. 식용유지의 불포화도	30
4.2. 식용유지의 산화, 가열에 따른 산패도	32
4.2.1. 과산화물가	32
4.2.2. Thiobabituric acid test	34
4.2.3. p-Anisidine value	36
4.2.4. 산가	38
4.3. 유지의 다환방향족탄화수소 분석	40
4.3.1. 분석법 검증	40
4.3.2. 식용유지의 다환방향족탄화수소 분석 결과	43
4.3.3. Triglyceride 가열 후 다환방향족탄화수소 분석 결과	49
4.4. 유지 산패도가 다환방향족탄화수소 생성에 미치는 영향	51
4.4.1. 유지 산패 지표의 적절성 평가	51
4.4.2. 유지의 산패도가 다환방향족탄화수소 생성량에 미치는 영향	53
4.4.3. 유지의 산패도 외 다환방향족탄화수소 생성에 영향을 미칠 수 있는 요인	57
5. 요약 및 결론	59
6. 참고문헌	61
Abstract	70

List of Tables

Table 1. Formula and physical properties of EPA 16 PAHs and carcinogen classification.	4
Table 2 Fatty acid composition of cooking oils	14
Table 3 Reagents and apparatus used in rancidity and unsaturation test of vegetable oils	16
Table 4 PAHs targets and internal standards	22
Table 5 Reagents and apparatus used in sample preparation for PAHs determination	24
Table 6 GC–MS condition for PAHs analysis	27
Table 7 Selected ion monitoring(SIM) conditions for PAHs standard and internal standards	27
Table 8 Iodine value of vegetable oils	31
Table 9 Recoveries of the six PAHs spiked at two levels in 2 matrix.	42
Table 10 Limit of detection(LOD) and limit of quantitation(LOQ) of six PAHs in 2 matrix	42
Table 11 Occurrence of six PAHs in oils according to the oxidation period and heating at 200°C for 6hrs.	45
Table 12 Occurrence of six PAHs in fume after heating according to the oxidation period at 200°C for 6hrs.	47
Table 13 Occurrence of six PAHs in synthetic triglycerides after heating	50
Table 14 Correlation coefficient between unsaturation of oils and rancidity slope of oils according to oxidation periods	52
Table 15 Correlation coefficient between lipid rancidity before heating and PAHs in heated oils according to the oxidation periods ...	55
Table 16 Occurrence of PAHs in each oils	58

List of Figures

Figure 1 Structure of EPA 16 PAHs	5
Figure 2 Benzo[<i>a</i>]pyrene activation pathway	8
Figure 3 Iodine value of vegetable oils	31
Figure 4 Peroxide value of vegetable oils according to oxidation periods and heating	33
Figure 5 Thiobarbituric acid(TBA) value of vegetable oils according to oxidation periods and heating	35
Figure 6 p-Anisidine value of vegetable oils according to oxidation periods and heating	37
Figure 7 Acid value of vegetable oils according to oxidation period and heating.	39
Figure 8 Calibration curves of six PAHs with internal standards	41
Figure 9 Regression assessments whether lipid rancidity indices account for the formation of six PAHs in oil, fume and oil+fume.	56

1. 서론

다환방향족탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)는 2개 이상의 방향족 고리가 융합되어 있는 유기화합물로, 화학연료의 불완전 연소나 유기 물질의 열분해(pyrolysis) 등에 의해 주로 발생한다(EFSA 2008b). 즉, 유기 화합물이 높은 온도에서 부분적으로 불안정한 물질인 radicals 등으로 분해된 후 상대적으로 보다 안정한 PAHs로 재결합되는 과정을 통해 PAHs가 생성된다.(Lee, M. L. et al. 1981).

한편, PAHs가 생리적으로 활성을 나타내기 위해서는 체내에서 반드시 효소에 의해 대사되어야 한다(Wood, A.W. 1982). 그리고 이 때 PAHs 구조상 benzo-ring의 bay 부분에 생기는 diol-epoxide의 생성 여부가 궁극적으로 돌연변이성 및 발암성을 결정하는 주요 체내 대사 경로임이 밝혀졌다(Jernia, D.M. 1980).

PAHs는 내분비계장애물질이며 발암가능물질이고 잔류기간이 길고 독성이 강하여 Codex와 JECFA(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) 등에서 위해관리를 위한 대상물질에 포함하는 등 세계적인 관심을 받는 오염물질이다(Dabestani, R. 1999, Vo-Dinh, T. et al. 1998). PAHs 중 특히 benzo[a]pyrene은 국제암연구소(IARC, International Agency for Research on Cancer)에서 1급 발암물질(carcinogenic to humans)로 분류하여 관리하고 있다(IARC 1983).

한편, 식품에서 PAHs는 굽기, 볶기, 훈연, 건조, 튀김 등 열을 이용한 조리 및 가공과정에서 탄수화물, 단백질 및 지질 등이 분해되어 생성된다.(European commission 2002, Alomirah, H., et al. 2011, Farhadian, A. et al. 2010) 특히 육류, 어류 및 유지류 등 지방 함량이 높은 식품에서 특히 많이 생성되며, 여러 식품 급원 중에서도 개별 PAHs 함량이 가장 높은 것은 식물성 식용유지로 조사되었다(Ilwon, S. et al. 2009). 이는 친유성(lipophilicity)이 강한 PAHs의 특성로 인해, 식품에서는 지질과 같은 매질에서 PAHs가 다량 발견될 수 있기 때문이다(Moret, S. et al 2000). 또한 국내 및 해외(영국, 유럽, 독일, 호주/

뉴질랜드 등)에서는 식품 중 4종의 PAHs 함량에 대한 실태조사를 진행하였으며, 이 중 다수의 식용유지에서 PAHs가 검출되었다(FSA 2012, EFSA 2008a, Speer K. et al. 1990, FSANZ 2004.). 게다가, 중국 여성의 폐암환자가 증가한 것이 유지 가열 시 발생하는 fume과 관련이 있다는 연구들이 보고되기도 하였다(Gao, Y.T. et al. 1987, Wu-Williams A.H. et al. 1990).

따라서 기름을 가열하는 등의 조리 방법은 일상에서 자주 사용되기 때문에, 식용유지 가열 후 PAHs 생성량을 줄이기 위해서는 어떤 요인이 식용유지 내 PAHs 생성량에 영향이 있는지 알아볼 필요가 있다. 국내외 연구 중 튀김 시 유지의 PAHs 함량을 조사한 연구는 있었으나 (Purcaro, G. et al. 2006, In sook K. et al. 1994, In sook K. et al 1993, Chen Y. C. et al. 2003), 유지의 어떤 특성이 PAHs 생성과 관계가 있는지에 대한 연구는 Chen, B.H. et al (2001)의 methyl fatty acids를 가열하여 불포화도가 PAHs 생성에 미치는 영향에 대한 연구가 유일하다.

따라서 본 연구에서는 PAHs 6종을 대상으로 하여, 가열 전 유지의 산패도가 유지 가열 후 PAHs 생성에 미치는 영향에 대해 분석하였다. 특히 유지의 산패도는 4가지의 서로 다른 산패 지표를 측정하였고, PAHs 생성량은 가열 후 oil과 fume 각각을 분석함으로써 식용유지 가열 시 발생할 수 있는 모든 PAHs 생성량을 고려하였다. 특히 본 연구에서 사용한 oil 전처리법은 PAHs 분석으로는 처음으로 시도한 것으로서, 기존의 복잡하고 오래걸리는 전처리법을 시간과 비용 측면에서 간소화하였다. 그리고 불포화도가 다른 4종의 synthetic tryglyceride를 같은 방법으로 가열 후 PAHs 생성량을 분석하였고, PAHs 생성에 영향을 미칠 수 있는 유지의 발연점과 유지의 다른 산화생성물의 영향에 대한 논의를 추가하였다. 이를 통해 유지 가열 시 PAHs 생성에 영향을 미치는 요인에 대해 알아보고자 하였다.

2. 문헌고찰

2.1. 다환방향족탄화수소의 특성

다환방향족탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)는 2개 이상의 방향족 고리가 융합되어져 있는 유기화합물로, 화학연료의 불완전 연소나 유기 물질의 열분해(pyrolysis) 등에 의해 주로 발생한다(EFSA 2008b). 즉, 유기 화합물이 높은 온도에서 부분적으로 불안정한 물질인 radicals 등으로 분해된 후 상대적으로 보다 안정한 PAHs로 재결합되는 과정을 통해 PAHs가 생성된다.(Lee, M. L. et al. 1981). 순수한 화합물으로써 PAHs는 보통 무색, 흰색 또는 황록색의 고체로 존재한다(ASTDR, 1995). 미국 환경보호청(US EPA)에서 인체 노출 및 발암성에 따라 우선 관리대상 오염물질로 분류한 16종의 PAHs의 분자식과 물리적 특성, IARC 발암등급을 Table 1에, 구조를 Figure 1에 나타내었다. Table 1의 수치들은 Reaxys database에서 검색하여 2000년대 이후의 논문들에서 제시한 값을 재인용한 것이다. PAHs는 구조상 친유성(lipophilicity)이 강하여, 식품 내 지질과 같은 매질에서 PAHs가 다량 발견될 수 있다(Moret, S. et al 2000).

Table 1. Formula and physical properties of EPA 16 PAHs and carcinogen classification.

Name	Molecular formula	Molecular weight	Boiling ^a point (°C)	IARC
Naphthalene	C ₁₀ H ₈	128.18	218	2B*
Acenaphthylene	C ₁₂ H ₈	152.20	265–280	2B
Acenaphtene	C ₁₂ H ₁₀	154.20	277–279	3 [†]
Fluorene	C ₁₃ H ₁₀	166.23	293–295	3
Anthracene	C ₁₄ H ₁₀	178.24	340	3
Phenanthrene	C ₁₄ H ₁₀	178.24	339–340	3
Fluoranthene	C ₁₆ H ₁₀	202.26	375–393	3
Pyrene	C ₁₆ H ₁₀	202.26	360–404	3
Benzo [<i>a</i>] anthracene	C ₁₈ H ₁₂	228.30	435	2B
Chrysene	C ₁₈ H ₁₂	228.30	441–448	2B
Benzo [<i>b</i>] fluoranthene	C ₂₀ H ₁₂	252.32	481	2B
Benzo [<i>k</i>] fluoranthene	C ₂₀ H ₁₂	252.32	480–481	2B
Benzo [<i>a</i>] pyrene	C ₂₀ H ₁₂	252.32	493–496	1 [‡]
Benzo [<i>g,h,i</i>] perylene	C ₂₂ H ₁₂	276.34	524	3
Indeno[1,2,3- <i>c,d</i>] pyrene	C ₂₂ H ₁₂	276.34	–	2B
Dibenzo [<i>a,h</i>] anthracene	C ₂₂ H ₁₄	278.35	525	2A [¶]

^a data cited from articles published after 2000s in Reaxys Database

* 2B: Possibly carcinogenic to humans, [†] 3: Not classifiable as to its carcinogenicity to humans, [‡] 1: Carcinogenic to humans, [¶] 2A :Probably carcinogenic to humans

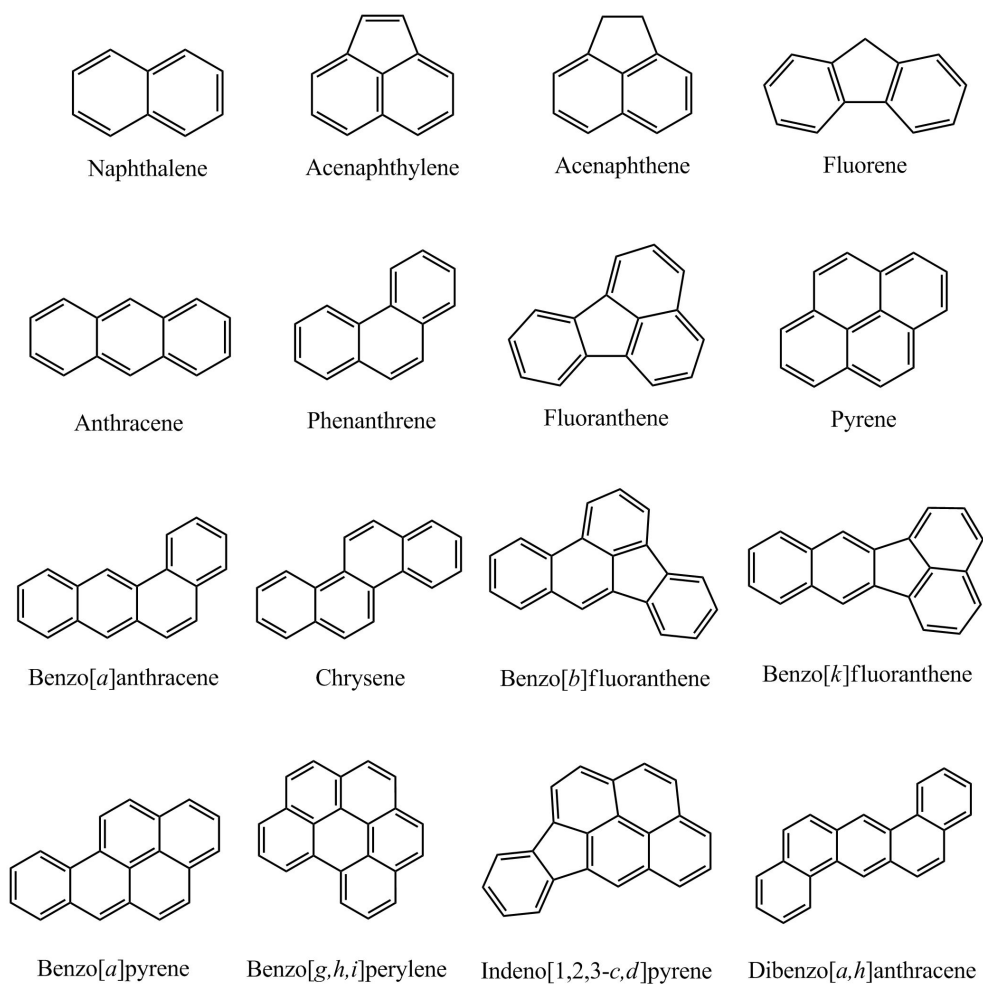


Figure 1. Structure of EPA 16 PAHs

2.2. 다환방향족탄화수소의 노출원 및 발암기작

PAHs는 다양한 경로로 인체에 노출될 수 있지만, 일반적으로 인체에 흡수되는 PAHs의 대부분은 식품 섭취로 인해 노출된다. 식품은 공기, 토양, 물에 존재하는 PAHs로 인해 오염되거나, 가열, 건조, 훈연 등의 가공과정 및 굽기 등의 조리 과정에서 PAHs가 생성됨으로 인해 PAHs가 존재할 수 있다(EFSA 2008b, Alomirah, H., et al. 2011, Farhadian, A. et al. 2010). 또한 공기 중의 PAHs 흡수로 인해 노출될 수도 있는데, 이와 관련하여 중국 여성의 폐암환자가 증가한 것이 유지 가열 시 발생하는 fume과 관련이 있다는 연구들이 보고되기도 하였다(Gao, Y.T. et al. 1987, Wu-Williams A.H. et al. 1990).

한편, PAHs 중 가장 대표적인 발암성 물질인 benzo[a]pyrene은 여러 종의 동물실험에서 암을 일으키는 것으로 알려져 있으며 국제암연구소(IARC, International Agency for Research on Cancer)에서 1급 발암물질(carcinogenic to humans)로 분류하여 관리하고 있다(IARC 1983). 또한 일부 PAHs는 호흡기 노출, 식품 섭취, 피부 흡수 등을 통해 실험 동물에서 종양을 유발하는 것으로 알려져 있다(ASTDR 1995).

PAHs는 친유성이 강한 화합물로서 폐에서 수동적 확산을 통해 흡수될 수 있으며, 소화기계에서는 지용성화합물의 흡수 기전을 통해서 흡수될 수 있다(Gerde, P. et al 1991). 그리고 benzo[a]pyrene은 옥수수유와 같은 일부 식용유지와 함께 섭취했을 때 흡수가 증진된다고 보고되었다(Kawamura, Y. et al. 1988). 흡수된 PAHs와 그 대사체들은 혈액을 통해 체내로 전달된다(Bartosek, I. et al. 1984).

한편, PAHs가 생리적으로 활성을 나타내기 위해서는 체내에서 반드시 간 등에 존재하는 cytochrome P-450과 같은 효소에 의해 대사되어야 한다(Wood, A.W. 1982). PAHs는 생체 내에서 반응 중간 생성물로 변환된 후 DNA 등과 결합하여 돌연변이나 발암을 유발한다. 이와 관련된 PAHs 대사체는 epoxide 대사체, dihydrodiols, phenols, quinones와 이들의 다양한 복합체들을 포함한다. 그리고 이 때 PAHs

구조상 benzo-ring의 bay 부분에 생기는 diol-epoxide의 생성 여부가 궁극적으로 돌연변이성 및 발암성을 결정하는 주요 체내 대사 경로임이 밝혀졌다(Figure 2). 이러한 diol-epoxide는 carbocation을 형성하여 알킬화를 일으킴으로 돌연변이성과 발암성을 일으키는 원인으로 작용한다고 알려져 있다(Jernia, D.M. 1980). 그러나 일부 발암성을 지니는 PAHs는 구조 상 bay 부분이 없거나 단순히 bay 부분의 diol epoxide로서 활성을 지닌다고는 볼 수 없다(Amin et al. 1985a, 1985b). 따라서 이들의 발암 기작이 다른 경로를 통해 일어나는 것이 밝혀질 경우 종양의 부위나 종 특이성이 다르게 나타날 것으로 예상된다(ASTDR 1995).

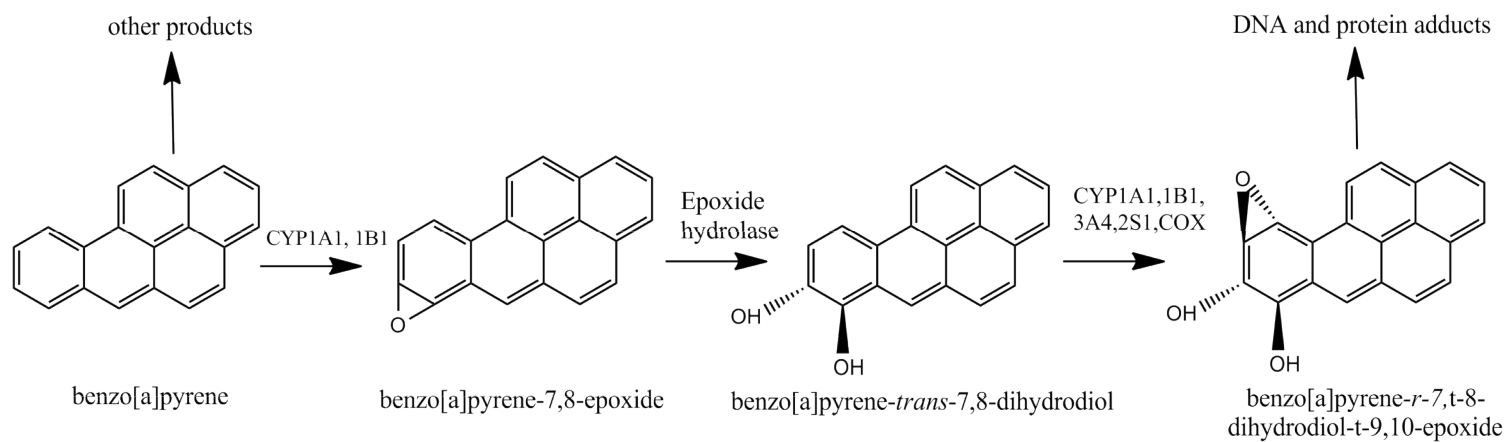


Figure 2 Benzo[a]pyrene activation pathway, cited from Bui, P.H. et al. (2009)

2.3. 식용유지 내 다환방향족탄화수소 함량 및 국가규제

국내에서 식품의약품안전처를 중심으로 식품 중 PAHs 4종 (benzo[a]anthracene, benzo[b]fluoranthene, chrysene, benzo[a]pyrene)에 대한 실태조사를 수행한 결과, 식용유지 중에서는 옥수수유에서 가장 높은 검출량($0.7418 \mu\text{g/kg}$)을 보였으며, 검출수준은 옥수수유 $0.20\sim 1.35 \mu\text{g/kg}$, 카놀라유 $0.03\sim 1.43 \mu\text{g/kg}$ 등이었다 (MFDS 2012).

해외에서는 영국 FSA에서 식품 중 PAHs에 대한 실태조사를 수행하였으나 식용유지류는 대상품목에 포함되지 않았고(FSA 2012), 유럽 EFSA에서 수행한 식품 중 PAHs 실태조사에서는 코코아버터를 제외한 식용유지 중에서 benzo[a]anthracene $1.03 \mu\text{g/kg}$, chrysene $3.13 \mu\text{g/kg}$, benzo[a]pyrene $0.89 \mu\text{g/kg}$ 검출되었다(EFSA 2008a). 독일에서 수행한 식품 중 PAHs 실태조사에서는 7종류의 식용유지류가 대상품목에 포함되었으며, 옥배유에서 benzo[a]pyrene이 $1.3 \mu\text{g/kg}$ 로 가장 높은 평균검출량을 보였다(Speer K. et al. 1990). 호주/뉴질랜드의 FSANZ에서는 식품 중 PAHs 실태조사를 수행하였고 식용유지로는 채종유가 포함되었다. 그 결과 benzo[a]anthracene이 $0.06 \mu\text{g/kg}$ 이하, chrysene이 $0.1 \mu\text{g/kg}$ 이하, benzo[a]pyrene $0.08 \mu\text{g/kg}$ 이하로 검출되었다(FSANZ 2004).

우리나라는 식용유지에서 PAHs 중 benzo[a]pyrene의 기준을 $2.0 \mu\text{g/kg}$ 로 설정하고 있다. 외국의 경우, 캐나다는 olive pomace oil에 한해 $3 \mu\text{g/kg}$, 중국은 유지와 유지 가공품에 대해 $10 \mu\text{g/kg}$, EU는 코코아버터와 코코아 오일을 제외한 유지에 대해 $2.0 \mu\text{g/kg}$ 로 관리하고 있다. 특히 EU의 경우, benzo[a]pyrene 만으로는 PAHs 관리 지표로 부족하다 판단하여 2006년부터 PAHs 4종 (benzo[a]anthracene, benzo[b]fluoranthene, chrysene, benzo[a]pyrene)으로 기준을 적용하고 있다(European commission 2011).

2.4. 다환방향족탄화수소 분석법

유지로부터 친유성이 강한 PAHs를 추출하기 위해서는 액-액 분리법 또는 caffeine 복합체 형성법이나 검화 방법이 주로 쓰인다.

액-액 분리법은 유지를 cyclohexane에 용해시킨 후 dimethylformamide:water (9:1) 용액 (Hopia, A. et al. 1986, Speer, K. 1990)으로 PAHs를 추출한다. 유지의 대부분의 구성성분인 triglyceride가 주로 녹아있는 cyclohexane을 제거한 후, 추출액을 증류수로 희석하여 분리계수를 바꿔줌으로써 PAHs를 역으로 다시 cyclohexane에 추출한다. cyclohexane은 낮은 온도에서 쉽게 증발되기 때문에 농축 후 정제 단계에 쓰이기 적합하다.

caffeine 복합체 형성을 통해 PAHs를 추출하기도 하는데, 이는 유지를 cyclohexane에 녹인 후 caffeine-formic acid 용액으로 세차게 섞어 선택적으로 PAHs를 추출하는 방법이다. 그리고 복합체를 2% NaCl 용액으로 분해시킨 후 cyclohexane으로 PAHs를 추출하는 방법이다 (Kolarovic, L. et al 1982).

검화 방법은 유지를 KOH용액에 녹여 40분 이상 속슬렛 추출을 하여 기름을 제거하고, 검화되지 않은 부분은 cyclohexane을 통해 제거하여 PAHs를 추출하는 방법이다(Moret, S. et al 2000).

추출액에 포함된 PAHs 외 다른 화합물들은 기기분석 시 PAHs 검출을 방해할 수 있다. 따라서 추출 후에 추가적으로 정제 과정이 필요한데, column-chromatography가 주로 쓰이며, column의 충전제로는 silica gel, alumina florisil 등이 주로 사용된다(Lee, M. L. et al. 1981)

최종적으로 PAHs는 기기분석을 통해 검출되는데, GC 또는 high-performance liquid chromatography (HPLC) 기술이 현재 널리 쓰인다(Moret, S. et al 2000).

2.5. 유지의 불포화도와 산패도

유지의 불포화란 유지의 지방산 사슬에 이중결합이 하나 이상 존재하는 것을 말하며, 유지의 불포화도가 높을수록 유지의 산화가 쉽게 일어난다고 알려져 있다(Labuza, T. P. et al. 1971).

유지의 불포화도는 요오드가를 측정하여 나타내는데, Hanus and Huble, Hofman and Green, Rosenmund and Kuhnhenh 등 여러 가지 측정방법이 개발되었으나 Wijs method가 표준 방법으로 가장 널리 쓰인다(Kyriakidis, N.B. et al. 2000). Wijs method는 American Oil Chemists' Society official methods Cd 1-25에 소개되어 있다(Mehlenbacher, V. C., et al. 2009).

유지의 산패는 유지에서 불쾌한 냄새가 나고 맛이나 빛깔이 변하는 일을 말한다(Luck, E. et al. 2000). 유지의 산패는 크게 가수분해형 산패와 세균성 산패, 산화형 산패 세 가지로 나눌 수 있다. 가수분해형 산패는 유지의 triglyceride 형태 구조가 가수분해되어서 free fatty acid가 생성되는 것으로 수분과 함께 촉매가 필요하기도 하다. 세균성 산패는 박테리아나 곰팡이로 인해 발생하는 것으로, 이러한 미생물들이 lipase와 같은 효소로 지방을 분해하면서 일어난다. 산화형 산패는 공기 중의 산소와 관련이 있으며, free radicals에 의해 불포화지방산의 이중결합이 분해되면서 휘발성 aldehydes와 ketones 등을 생성하면서 발생한다(Freeman, I. P. 2000, Labuza, T. P. et al. 1971).

따라서 수분이나 세균의 영향이 비교적 적은 식용유지의 경우 산패의 원인이 대부분 산화형 산패라고 볼 수 있다. 이러한 유지의 산패를 측정하는 방법은 다양하다. 유지 산화 초기에 발생하는 과산화물을 측정하는 과산화물가와, 2차 산화 생성물인 aldehydes를 측정하는 p-anisidine value (주로 2-alkenals, 2,4-dienals을 측정)와 thiobarbituric acid (TBA) test(주로 malondialdehyde 측정)가 대표적인 화학적 측정방법이다. 이 외에도 high performance liquid chromatography로 과산화물

을 측정하거나, gas chromatography, simultaneous distillation extraction, solid phase microextraction 등으로 휘발성 화합물을 측정하는 등의 기계적 방법이 있다(Gray, J.I. 1978, Irwin J.W. et al. 2004). 또한 산가는 가수분해형 산패로 인해 발생한 유리지방산을 측정하는 것이지만, 유지의 산화 생성물과 함께 주로 측정되는 산패 지표이기도 하다(Irwin J.W. et al. 2004).

3. 재료 및 방법

3.1. 시료 준비

3.1.1. 시료 선택

식용유지는 같은 회사에서 제조된 정제유 7종(해바라기유, 포도씨유, 카놀라유, 쌀눈유, 옥수수유, 견과유, 대두유)을 사용하였다. 또한 식용유지 내 주로 존재하는 fatty acid 4종(Table 2) 각각의 triglyceride 형태 화합물인 Glyceryl tripalmitate(Alfa-Aesar, U.K), Glyceryl tristearate(Kimnfriends, Korea), Glyceryl trioleate(Kimnfriends, Korea), Glyceryl trilinoleate(TCI, Japan)를 구입하였다.

3.1.2. 유지 산화

시중에서 구입한 정제유 70g을 100ml Erlenmeyer flask에 담아 5g의 철을 첨가한 뒤, 자외선램프 아래에서 stirring bar로 섞어주면서 공기에 노출시켜 각각 2주, 4주, 8주간 산화시켰다.

3.1.3. 유지 가열

산화 전, 후의 식용유지와 synthetic triglyceride 1.2g을 각각 vial ($\Phi 19 \times h 68$ mm, Wheaton, USA)에 담고 PTFE filter($0.45 \mu\text{m}$, 13mm)를 장착한 screw cap으로 밀봉한 뒤 200℃에서 6시간 동안 가열하였다. PTFE filter는 유지 가열 시 발생하는 fume에서의 PAHs를 포집하기 위해 장착하였다. 그리고 가열된 유지와 PTFE filter를 각각 다른 전처리 방법을 통해 분석하여 oil과 fume 각각의 PAHs 생성량을 알아내었다.

Table 2 Fatty acid composition of cooking oils

Oils	Country of origin	Fatty acids (%)				
		C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Sunflower ^a	Canada	5.76	4.76	16.86	70.69	0.28
Grape seed ^b	USA	7.05	2.52	13.9	75.3	0.41
Canola ^a	Canada	3.75	1.87	62.41	20.12	8.37
Rice bran ^a	USA	14.24	2.13	43.87	36.28	0.99
Corn ^a	USA	10.34	2.04	25.54	59.27	1.07
Peanut ^a	USA	9.40	2.65	47.81	31.06	0.23
Soybean ^a	USA	9.63	4.38	23.44	52.92	7.60

^a data cited from Zambiasi, R. C. et al. (2007),

^b data cited form Lutterodt, H. et al. (2011)

3.2. 유지의 불포화도와 산패도 측정

유지의 불포화도를 구하기 위해 구입한 그대로의 기름에 대해 요오드가 (iodine value, IV)를 측정하였다. 그리고 식용유지별 산화기간에 따른 산패 측정을 위해 대표적인 산패 지표인 과산화물가 및 TBA test, p-anisidine value, 산가를 측정하였다.

3.2.1. 시약 및 기기

유지의 불포화도와 산패도 분석에 사용한 시약 및 기기는 Table 3과 같다.

Table 3 Reagents and apparatus used in rancidity and unsaturation test of vegetable oils

Product	Manufacturer (Nation)	Grade	Remarks ^a
Ethyl alcohol	Samchun (Korea)	Special	AV
Ethyl ether	Samchun (Korea)	Special	AV
Phenolphthalein	Kanto chemical (Japan)		AV
Potassium hydroxide	Junsei (Japan)		AV
Glacial acetic acid	Samchun (Korea)	Special	POV, p-A.V., IV
Chloroform	Fisher (USA)	HPLC	POV, IV
Potassium iodide	Samchun (Korea)	Special	POV
Starch	Sigma (USA)		POV
Sodium thiosulfate	Junsei (Japan)		POV
4,6-Dihydroxy-2- -mercaptopyrimidine (2-thiobarbituric acid)	Acros organics (USA)		TBA
1,1,3,3- Tetraethoxypropane	Sigma-aldrich (USA)		TBA
1-butanol	Junsei(Japan)		TBA
Hexane	Merck (Germany)	GC	p-A.V.
Iodine monochloride	Junsei (Japan)		IV
SI-600R (Shaking incubator)	Jeio tech (Korea)		
Optizen 2120UV UV/VIS spectrophotometer	Mecasys (Korea)		TBA, p-A.V.
Labmax dispenser	Witeg (Germany)		AV, POV, IV

^a AV, acid value; IV, iodine value; POV, peroxide value; p-A.V., p-anisidine value; TBA, thiobarbituric acid test.

3.2.2. 요오드가(Iodine value)

요오드가는 AOCS Official Method Cd 1-25(Mehlenbacher, V. C. et al. 2009)를 참고하였다. 가열 전 유지 0.20g을 250ml Erlenmeyer flask에 달아 놓고, Chloroform 10ml를 넣었다. 마개를 막고 혼합한 시료를 완전히 용해한 후 25ml의 wijs 시약(ICl 8.4g in 1L glacial acetic acid)를 넣고 섞었다. 암소에 1시간 방치 후 15% KI용액 20ml와 증류수 100ml, 1%의 전분용액 1ml을 넣고 힘차게 섞었다. 0.1N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 수용액으로 전분의 청남색이 소실되는 시점을 종말점으로 하여 3회 반복 측정하였다.

$$\text{요오드가(g/100g)} = (A-B) \times 0.01269 \times f \times 100 \times (1/S)$$

A: 공시험에서 0.1N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 용액의 소비량(ml)

B: 본 실험에서 0.1N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 용액의 소비량(ml)

f: 0.1N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 용액의 농도계수

S: 시료의 채취량(g)

3.2.3. 과산화물가(Peroxide value)

과산화물가의 측정은 AOCS Official method Cd 8b-90 (Mehlenbacher, V. C. et al. 2009)에 따라 실시하였다. 즉, 가열 전 유지는 1.0g, 가열 후 유지는 0.50g을 250ml Erlenmeyer flask에 넣고 25ml의 acetic acid:chloroform(3:2) solution을 첨가하여 흔들어 섞어주었다. KI 포화수용액 1ml를 넣고 암소에서 10분간 진탕한 후 꺼내어 30ml의 증류수를 넣고 세게 섞어주었다. 1% starch 수용액 약 10방울을 넣고 흔들어 섞어 준 뒤 0.01N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 수용액으로 청색이 사라지는 시점을 종말점으로 하여 3회 반복 측정하였다.

$$\text{과산화물가}(\text{meq/kg}) = (A-B) \times f \times (1/S) \times 10$$

A: 본 실험에서 0.01N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 의 적정 소비량(ml)

B: 공시험에서 0.01N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 의 적정 소비량(ml)

f: 0.010N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 용액의 농도계수

S: 시료의 채취량(g)

3.2.4. Thiobarbituric acid value(TBA test)

TBA test의 측정은 AOCS Official Method Cd 19-90 (Mehlenbacher, V. C. et al. 2009)을 변형한 실험법을 사용하였으며 calibration curve를 위한 standard는 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP, Sigma-aldrich)를 사용하였다(Berasategi, I. et al. 2012). 가열 전 유지는 0.30g을, 가열 후 유지는 0.10g을 1-butanol로 각각 5ml, 10ml volumetric flask에 채워 용해 및 희석시켰다. 건조된 vial에 1.0ml의 fat solution과 1.0ml의 reagent solution(200mg 2-thiobarbituric acid in 100ml 1-butanol)을 넣고 마개로 닫은 뒤 항온수조(95℃)에서 120분간 진탕하였다. vial을 꺼내어 흐르는 물에 약 10분간 방치하여 상온에 도달하게 한 뒤 1cm cuvette에 담아 535nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 reference cuvette은 distilled water로 하였다. TEP 50-400ppm을 위와 같은 방법으로 실험하여 calibration curve를 작성하였고, TBA test 결과값을 mmol malondialdehyde equivalents/kg of oil(mmol MDA/kg)로 나타내었다.

3.2.5. p-Anisidine value

p-Anisidine value의 측정은 AOCS Official method Cd 18-90(Mehlenbacher, V. C. et al. 2009)에 따라 측정하였다. 가열 전 유지는 1.0g, 가열 후 유지는 0.50g에 각각 hexane 25ml, 125ml를 넣고 용해시켰다. Fat solution 5ml을 vial에 넣고 1ml의 p-anisidine reagent(0.25g/100ml glacial acetic acid)을 첨가하여 섞었다. 정확히 10분 뒤 반응액과 fat solution을 각각 glass cuvette에 담아 350nm에서 흡광도를 측정하였다. Hexane으로 공시험을 하여 reference cuvette으로 하였다.

3.2.6. 산가(Acid value)

산가의 측정은 AOCS Official Method Cd 3d-63 (Mehlenbacher, V. C. et al. 2009)을 참고하여 실시하였다. 즉, 유지 0.30g을 250ml Erlenmeyer flask에 넣고 ethyl alcohol: ethyl ether(1:2 v/v) 50ml 을 넣어 지방을 희석하였다. 지시약 0.1% phenolphthalein을 약 5방울 넣고 흔들어 섞어 준 뒤 약 5분간 진탕하였다. 0.01N KOH ethyl alcohol solution으로 적정하여 연한 홍색이 약 30초간 지속될 때를 종 말점으로 하여 3회 반복 측정하였다.

$$\text{산가(mg KOH/g oil)} = (A-B) \times 0.561 \times f \times (1/S)$$

A: 본 실험에서 0.01N KOH 소비량(ml)

B: 공시험에서 0.01N KOH 소비량(ml)

f: 0.01N KOH 용액의 농도계수

S: 시료의 채취량(g)

3.3. 유지의 다환방향족탄화수소 분석

가열된 유지와 screw cap에 장착한 PTFE filter를 각각 따로 분석함으로써, oil 섭취 시 노출 될 수 있는 PAHs와 fume에서 노출될 수 있는 PAHs를 구분하여 분석할 수 있도록 하였다.

3.3.1. 다환방향족탄화수소 분석대상

IARC 및 미국 EPA의 발암등급 및 기존 검출항목을 고려하여 BaA, CHR, BbF, BaP, IP, DBahA 6종을 분석대상으로 선정하였다.

분석의 정확도 및 효율을 높이기 위해 2가지 내부표준물질(internal standard)인 CHR-d12, BaP-d12를 사용하였다(Table 4).

Table 4 PAHs targets and internal standards

PAHs	Abbreviation	Internal standard
Benzo[<i>a</i>]anthracene	BaA	CHR-d12
Chrysene	CHR	
Benzo[<i>b</i>]fluoranthene	BbF	
Benzo[<i>a</i>]pyrene	BaP	BaP-d12
Indeno[1,2,3- <i>c,d</i>]pyrene	IP	
Dibenzo[<i>a,h</i>]anthracene	DBahA	

3.3.2. 시약 및 기기

검정곡선용 다환방향족탄화수소 표준용액인 EPA 525 PAH mix-B와 내부표준물질인 CHR-d12, BaP-d12를 Supelco 사(USA)에서 구입하여 사용하였다. 식용유지와 PTFE filter 각각의 전처리법에서 표준물질과 내부표준물질을 동일하게 사용하였다. 내부표준물질 첨가 시 사용한 용매는 n-hexane으로 Merck(Germany)사에서 구입하였다.

가열된 유지 내 다환방향족탄화수소의 분석 시 추출 및 SPE 전 과정에서 사용한 acetonitrile은 Fisher scientific(USA) 제품을 사용하였고, 추출과정에서 사용한 centrifuge tube는 Corning(USA)사에서 구입하였다. SPE에 사용한 C18 cartridge(1g, 6cc)는 Macherey-nagel(Germany)에서 구입하였고, basic alumina는 Sigma-aldrich(USA) 제품을 사용하였다. cap에 장착했던 PTFE filter는 Woongki science(Korea)에서 구입하였고, filter 추출에 사용한 DCM은 Fisher scientific(USA) 제품을 사용하였다.

실험에 사용한 진탕기는 Scientific industries(USA)사의 Vortex Genie2를 사용하였고, 질소농축기는 청민테크(Korea)의 Hurricane-Lite를 사용하였다. 가열된 유지 시료에 사용한 저온원심분리기는 Gyrozen(Korea)의 Labogene centrifuge를 사용하였고, 얼음생성기는 Dongjinlab(Korea)의 Brema ice maker를 사용하였다. 실험에 사용한 시약 및 기기에 관한 자세한 내용은 Table 5에 나타내었다.

Table 5 Reagents and apparatus used in sample preparation for PAHs determination

Product	Manufacturer (Nation)	Grade	Remarks
EPA 525 PAH mix-B	Supelco (USA)		Standards for calibration curve
Chrysene-d12 solution	Supelco (USA)		Internal standards
Benzo(a)pyrene-d12	Supelco (USA)		Internal standards
n-Hexane	Merck (Germany)	GC	Standard solution
Dichloromethane	Fisher scientific (USA)		
Acetonitrile	Fisher scientific (USA)	Pesticide	SPE
C18 cartridge	Macherey-nagel (Germany)		
Basic alumina	Sigma-aldrich (USA)		
PTFE Membrane Filter	Woongki science (Korea)		
PTFE syringe Filter	Agela technologies (China)		
Syringe	Korea Vaccine (Korea)		
SPE manifold	Supelco (USA)		
SPE valve liners	Supelco (USA)		
Centrifuge tube	Corning (USA)		
Labogene Centrifuge	Gyrozen (Korea)		
SI-600R (Shaking incubator)	Jeio tech (Korea)		
Hurricane lite (nitrogen concentrator)	Chongmin Tech. (Korea)		
Brema ice makers	Dongjinlab (Korea)		
Vortex-Genie 2	Scientific industries (USA)		

3.3.3. 시료 전처리

내부표준물질로 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 CHR-d12, 10mg의 BaP-d12를 구입하여, hexane으로 희석하고 혼합하여 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 내부표준용액을 제조하였다. 이를 다시 hexane으로 희석하여 12.5ng/ml의 내부표준첨가용액을 제조하여 모든 시료에 첨가하였다.

3.3.3.1. 가열된 유지 시료의 전처리

가열된 유지 시료의 전처리 방법은 Esteve-Turrillas, F. A. et al. (2005)의 살충제 성분을 분석하기 위한 유지 전처리 방법을 변형하여 PAHs 분석에 적용하였다. 이 방법은 PAHs 분석으로는 처음 시도되는 전처리 방법으로, 기존의 복잡하고 오래 걸리는 전처리법을 시간과 비용 측면에서 간소화할 수 있었다.

즉, 유지 0.50g을 15ml centrifuge tube에 담고, 유리피펫을 사용하여 acetonitrile 4ml를 넣고 1분간 vortex로 섞어주었다. 플라스틱을 사용하면 GC target peak에 간섭할 수 있는 오염물질이 유기용매에 녹아나올 수 있으므로, 가급적 유리피펫을 사용하도록 하였다. 이를 3000rpm, -4°C 에서 5분간 원심분리를 한 뒤 상층액을 분리하는 과정을 3회 반복하여 추출액을 얻었다. 특히 원심분리 후 tube를 얼음에 담가놓아 시간이 지나면서 지질층이 acetonitrile과 섞이는 것을 방지하였다. 정제를 위해 C18 1g 카트리지에 약 2g의 basic alumina oxide powder를 채워 넣은 후, 10ml의 acetonitrile로 씻어 내어 버리고 앞서 얻은 추출액을 loading 하여 elution용액을 얻었다. 그리고 cartridge를 acetonitrile 15ml로 washing하였다. Loading과 washing으로 얻은 elution용액을 40°C 질소가스 하에서 건조시켜 모든 용매를 제거한 뒤, 200 μl 의 acetonitrile을 첨가 후 vortex로 잘 섞어주었다. 이를 0.45 μm PTFE syringe filter로 거른 뒤 시험용액으로 하였다.

3.3.3.2. PTFE filter 전처리

Screw cap에 장착되었던 PTFE filter의 전처리는 Pleil, J.D. et al. (2004)의 방법을 참고하였다. 즉, PTFE filter를 15ml glass vial에 담고 DCM 5ml를 가한 뒤, cap으로 밀봉하여 shaking incubator로 150rpm에서 10분간 진탕하였다. 핀셋으로 filter를 제거한 후 25℃ 질소가스 하에서 용매를 모두 건조시킨 뒤, 200 μ l의 acetonitrile을 첨가하고 vortex로 잘 섞어주었다. 그리고 0.45 μ m PTFE syringe filter로 거른 뒤 시험용액으로 하였다.

3.3.4. 기기분석

PAHs를 분석을 위한 GC-MS 분석조건은 Table 6과 같다. GC-MS 장비(Shimazu, Japan)에 DB-5MS column(30m \times 0.25mm I.D. \times 0.25 μ m film)을 장착하여 분석하였으며, 이동상으로 헬륨가스를 사용하였고 유속은 1.0ml/min으로 설정하였다. 주입량은 1 μ l로 하였고 역류를 막기 위해 high pressure injection mode(240.0kPa by 2min)를 사용하였다. 이온화방식은 EI(electron ionization) mode를 이용하였다. Auto sampler는 AOC-20i(Shimazu, Japan)를 사용하였다.

CHR-d12를 제외한 각 분석물질의 qualitative ion은 intensity가 quantitative ion 다음으로 높은 2개의 ion을 설정하였고, CHR-d12는 전처리과정에서 유입되는 오염물질로 인해 특정 이온에 간섭이 발생하여 ($m/z=241$), 간섭이 발생하지 않는 이온($m/z=236$)으로 qualitative ion을 대체하였다. 또한 가열된 유지를 전처리한 시료의 경우, 유지의 산화기간이 길어질수록 가열 시 BaP-d12의 target ion peak에 오염물질로 인한 간섭이 크게 발생하였다. 따라서 가열된 유지 시료의 경우 특정 정제유(포도씨유)에서 전처리 후 나타난 BaP-d12 회수율을 기준으로 하여 target 물질들을 일정한 비율로 보정하였다. PAHs 각 물질의 selected ion monitoring(SIM) 조건은 Table 7과 같다.

Table 6 GC–MS condition for PAHs analysis

Instrument	Shimadzu, JP/GCMS–QP2010 Ultra
Column type	DB–5MS (30m×0.25mm I.D.×0.25 μ m film)
Injection temperature	275°C
Injection type	Splitless (High pressure Injection with a 240.0kPa by 2min)
Column temperature program	50°C (3 min) → 120°C (25°C/min) → 250°C (10°C/min, 10min) → 270°C (10°C/min, 5min) → 300°C (30°C/min, 10min) [Total 46.80min]
Carrier gas	Helium (1.0mL/min)
Injection volume	1 μ l
MS Source temperature	250°C

Table 7 Selected ion monitoring(SIM) conditions for PAHs standard and internal standards

Compounds	Retention time ^a (min)	Quantitative ion (m/z)	Qualitative ion1 (m/z)	Qualitative ion2 (m/z)
BaA	23.15	228	226	229
CHR–d12	23.20	240	238	236
CHR	23.32	228	226	229
BbF	30.21	252	250	253
BaP–d12	31.97	264	260	265
BaP	32.11	252	250	253
IP	38.89	276	277	274
DBahA	38.94	278	279	276

^a Typical retention time in minutes – varies according to column condition, age, and exact length

3.3.5. 분석법 검증

사용한 분석방법의 신뢰성을 검증하기 위해 Association of Official Analytical Chemists (Horwitz, W. 2002)와 Codex(Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission, 1993)에서 제시한 가이드라인 방법을 참고하여 직선성(linearity), 정확도(Accuracy) 및 회수율(recovery), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantitation, LOQ)를 확인하였다.

3.3.5.1. 직선성(Linearity)

시료 정량을 위한 PAHs 6종의 검량선을 작성하기 위해 0.25, 0.5, 2.5, 5, 10, 20 μ g/kg of sample의 6개 포인트의 PAHs 6종 표준용액에 내부표준물질 CHR-d12, BaP-d12의 양이 5 μ g/kg이 되도록 표준용액을 제조하고 검량선을 작성하여 직선성을 확인하였다. y축은 area ratio, x축은 concentration ratio로 나타내었다.

3.3.5.2. 정확도(Accuracy) 및 회수율(Recovery)

표준용액 첨가법으로 5, 20 μ g/kg의 PAHs를 각 매질에 첨가한 뒤 5회 반복 분석하고, 회수된 PAHs 농도와 첨가용액 내 PAHs 농도를 비교하여 회수율을 산출함으로써 정확도를 검증하였다.

3.3.5.3. 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

검출한계 및 정량한계는 반응의 표준편차와 검량곡선의 기울기에 근거한 방법을 사용하였으며, 0.5 μ g/kg의 6PAHs 표준용액으로 7회 반복 측정하여 구한 표준편차를 σ 라 하고, 검정곡선의 기울기를 S라 할 때 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{LOD} = 3.3 \times \sigma / S$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \sigma / S$$

3.4. 통계처리

본 연구 결과의 통계처리는 IBM SPSS Statistics (Ver. 23) 프로그램을 이용하였다. one-way ANOVA를 실시하였고, 사후검정을 위해 Scheffe test를 실시하였다. 그리고 식용유지의 산패도가 유지 가열 시 PAHs 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 상관분석과 회귀분석을 하였다.

4. 결과 및 고찰

4.1. 식용유지의 불포화도

유지의 불포화도는 기름을 구입한 후 아무 변화를 가하지 않은 상태에서 측정하였다. Figure 7에 그래프로 나타낸 요오드가는 포도씨유에서 가장 높게 나타났으며 쌀눈유에서 가장 낮은 값을 보였다. 대부분 기름의 요오드가는 참고문헌과 비슷한 수준으로 측정되었다(Table 8).

Table 8 Iodine value of vegetable oils

Oils	Iodine value (g iodine/100g of oil)	
	Measured	Ref.
Sunflower	129.52 \pm 3.94	125–144 ^a
Grape seed	144.47 \pm 3.70	124–143 ^a
Canola	119.43 \pm 0.66	110–126 ^b
Rice bran	104.09 \pm 1.46	95–108 ^a
Corn	126.90 \pm 1.46	109–133 ^a
Nuts	118.20 \pm 2.88	—
Soybean	132.13 \pm 4.52	120–136 ^a

^a data cited from Thomas, A. (2000)

^b data cited from Kramer, J.K. (2012)

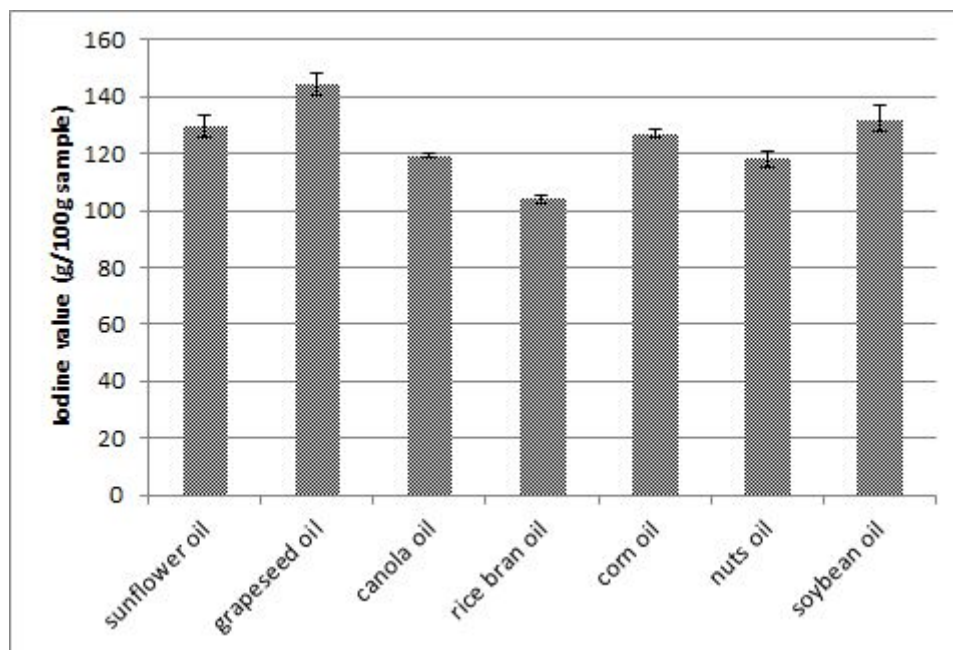


Figure 3 Iodine value of vegetable oils

4.2. 식용유지의 산화, 가열에 따른 산패도

4.2.1. 과산화물가(Peroxide value)

유지 산화기간에 따라 유지의 1차 산화물인 과산화물(Choe, E. et al. 2006)을 이용하여 유지의 산화 정도를 측정한 결과는 Figure 4와 같다. 과산화물 함량은 산화기간에 따라 모든 기름에서 증가하는 경향을 보였다. 가열 후에는 가열 전보다 과산화물 함량이 대체로 낮게 나타났는데, 이는 과산화물이 180℃에서 분해되기 때문(Perkins, E. G. et al. 1967)이다. 그러나 산화 전 유지들은 가열 후에 오히려 과산화물 함량이 가열 전보다 높게 측정되었다. 이는 가열 후에 식히고 보관하는 과정에서 대부분의 기름에 일정 수준의 과산화물이 생성되었을 가능성이 있다.

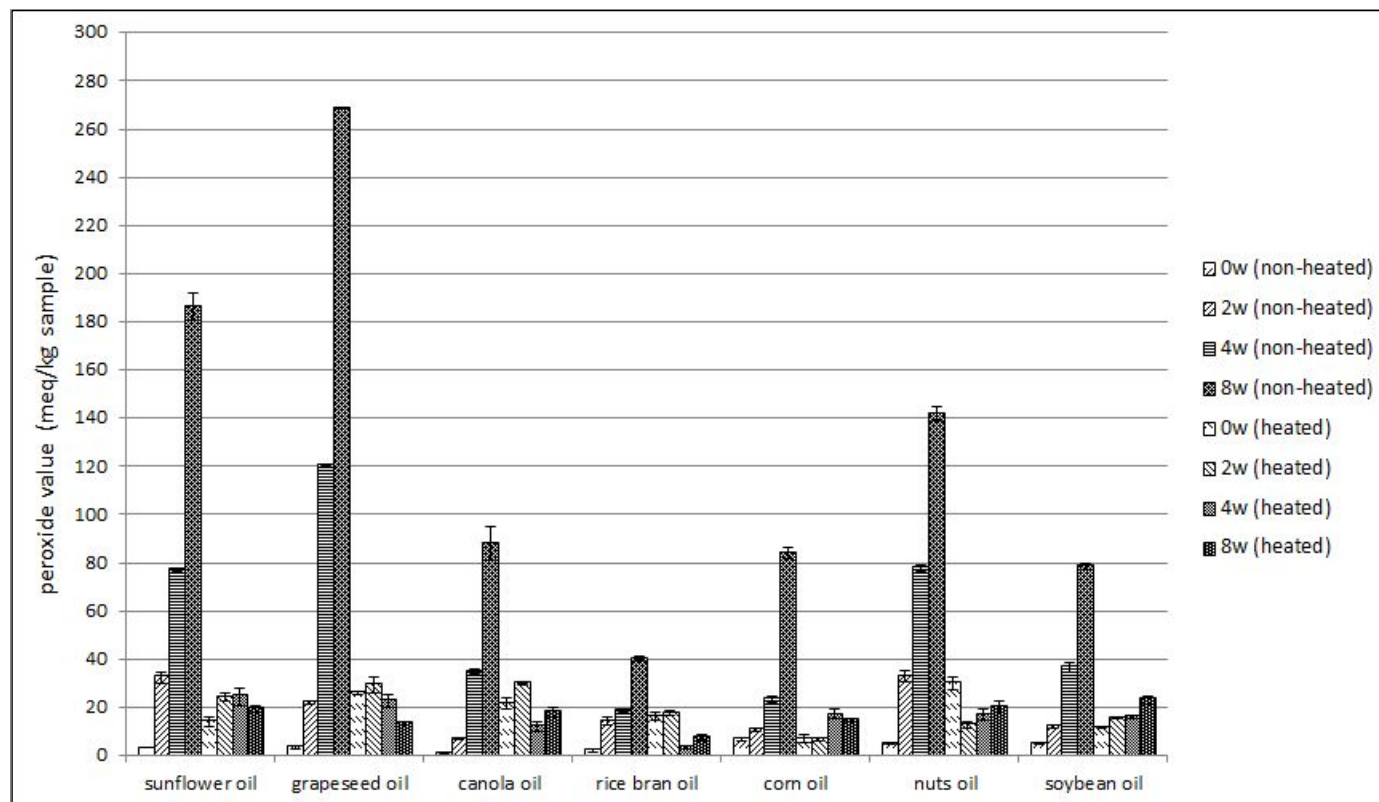


Figure 4 Peroxide value of vegetable oils according to oxidation periods and heating

4.2.2. Thiobarbituric acid test (TBA test)

유지의 산화 및 가열에 따른 TBA가의 변화를 Figure 5에 나타내었다. TBA가는 지방의 산화에 의해 생성되는 malonaldehyde(MDA)와 thiobarbituric acid가 반응하여 생성되는 붉은 색의 강도를 측정한 것으로 지질의 산화 정도를 나타내는 지표 중 하나이다(Guillen-Sans R. et al. 1998). 측정 결과 산화 기간에 따라 TBA가가 증가하는 경향을 보였는데, 특히 유지를 가열한 후 TBA가가 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 유지가 산화되면서 1차 생성물질인 hydroperoxide가 분해되어 2차 산화생성물인 유기산, 알데하이드, 케톤, 알코올, 카보닐기 및 중합체 생성물이 증가하였기 때문인 것으로 사료된다(Brewer M. S. et al. 1993). 견과유는 8주 산화된 기름에서 TBA가가 현저히 감소하였는데, 산화기간이 길어지면서 aldehydes가 아닌 다른 2차 산화생성물이 생성되었을 수 있다(1.3. p-anisidine value 참고).

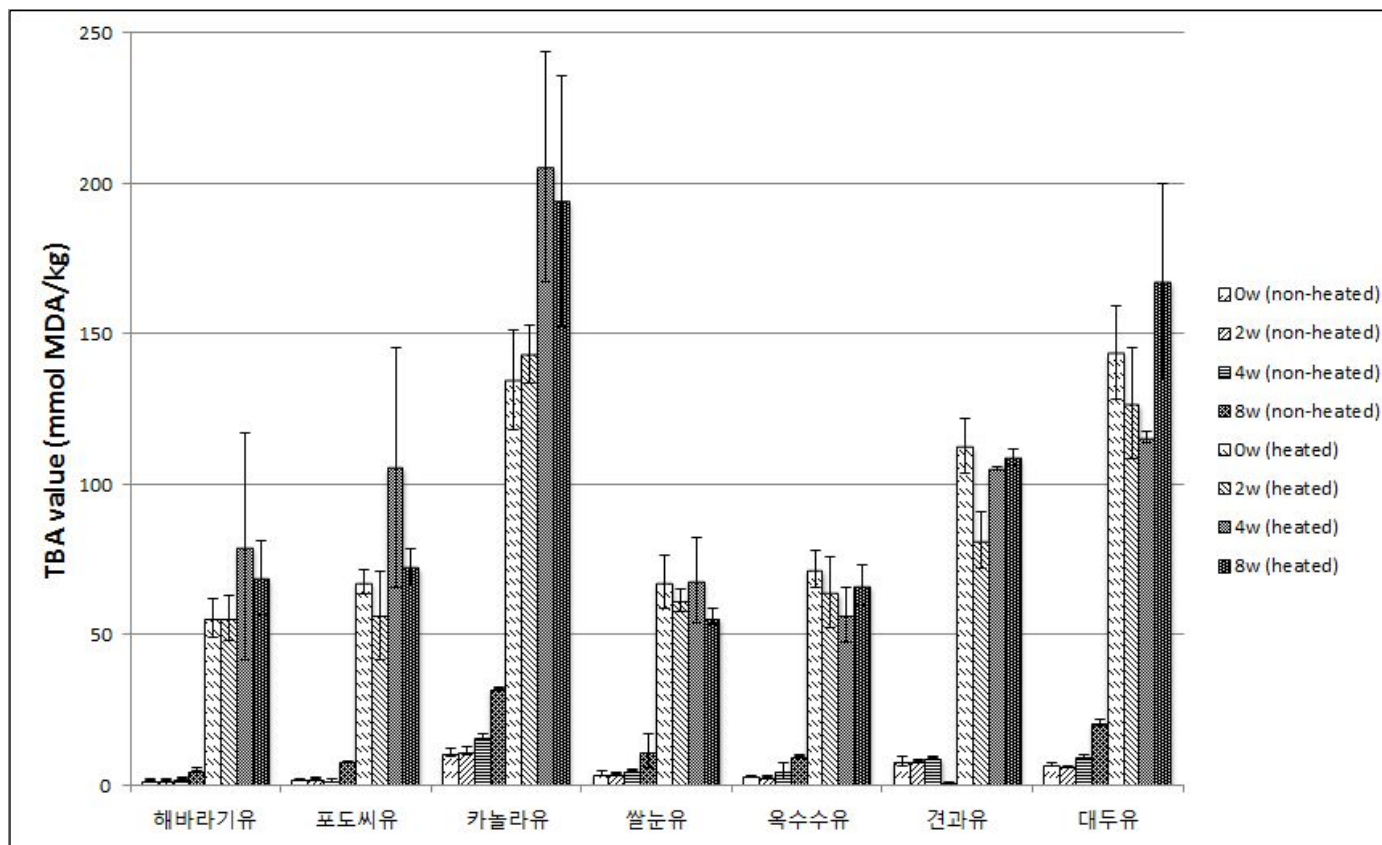


Figure 5 Thiobarbituric acid (TBA) value of vegetable oils according to oxidation periods and heating (MDA: malonaldehyde equivalent)

4.2.3. p-Anisidine value

유지의 산화 및 가열에 따른 p-anisidine가의 변화를 Figure 6에 나타내었다. p-Anisidine value는 유지 산화 시 발생하는 aldehyde 중 주로 2-alkenals과 2,4-dienals를 측정하는 것이다. aldehydes는 유지 산화시 발생하는 휘발성 화합물의 약 50%를 차지하는 2차 산화생성물이다.(Przybylski, 1995). 쌀눈유와 대두유를 제외한 모든 기름에서 8주 산화 시 p-anisidine value가 증가하는 경향을 보였다. 견과유는 TBA test에서 8주 산화 시 낮은 값을 보인 반면, p-anisidine value에서는 8주 산화 시 높은 값을 보인 것으로 보아 기름 종류에 따라 생성되는 2차 산화물의 종류가 상이할 수 있음을 알 수 있었다.

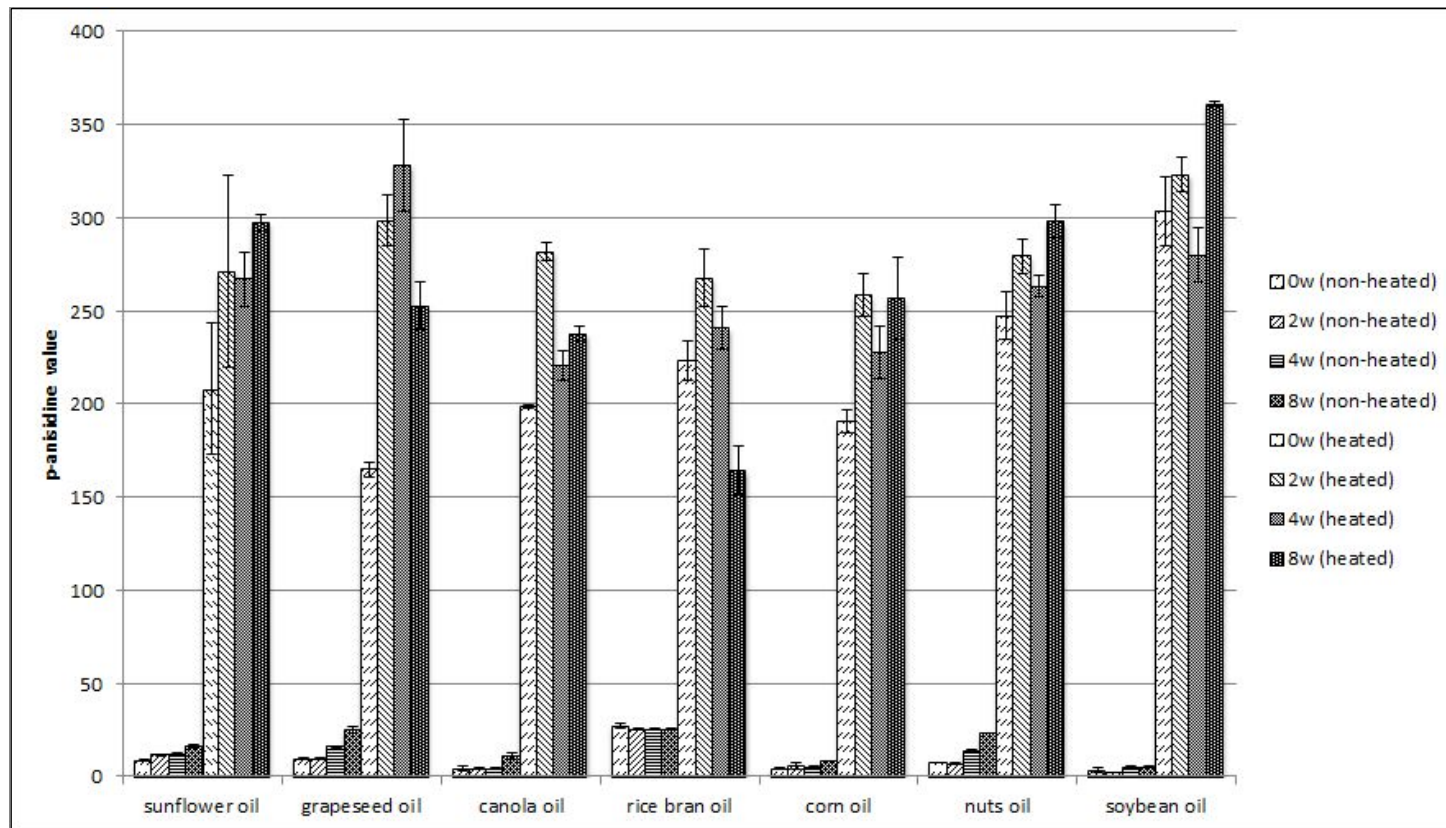


Figure 6 p-Anisidine value of vegetable oils according to oxidation periods and heating

4.2.4. 산가(Acid value)

산가는 유지의 가수분해로 인해 생성된 유리지방산을 측정하는 것이지만(Skiera et al. 2014), 유지의 산화 생성물과 함께 주로 측정되는 산패 지표이기도 하다(Irwin J.W. et al. 2004). 이에 유지의 산화기간에 따른 산가를 측정하였으며 그 결과를 Figure 7에 나타내었다. 측정 결과, 산가는 기간에 따라 일정하지 않은 경향을 보였는데, 특히 8주 산화시에 대부분의 기름에서 4주 산화된 기름보다 산가가 낮아지는 경향을 보였다. 이는 기름이 UV에 장시간 노출되면서 free fatty acids가 다른 물질로 분해되었을 가능성을 짐작해볼 수 있다.

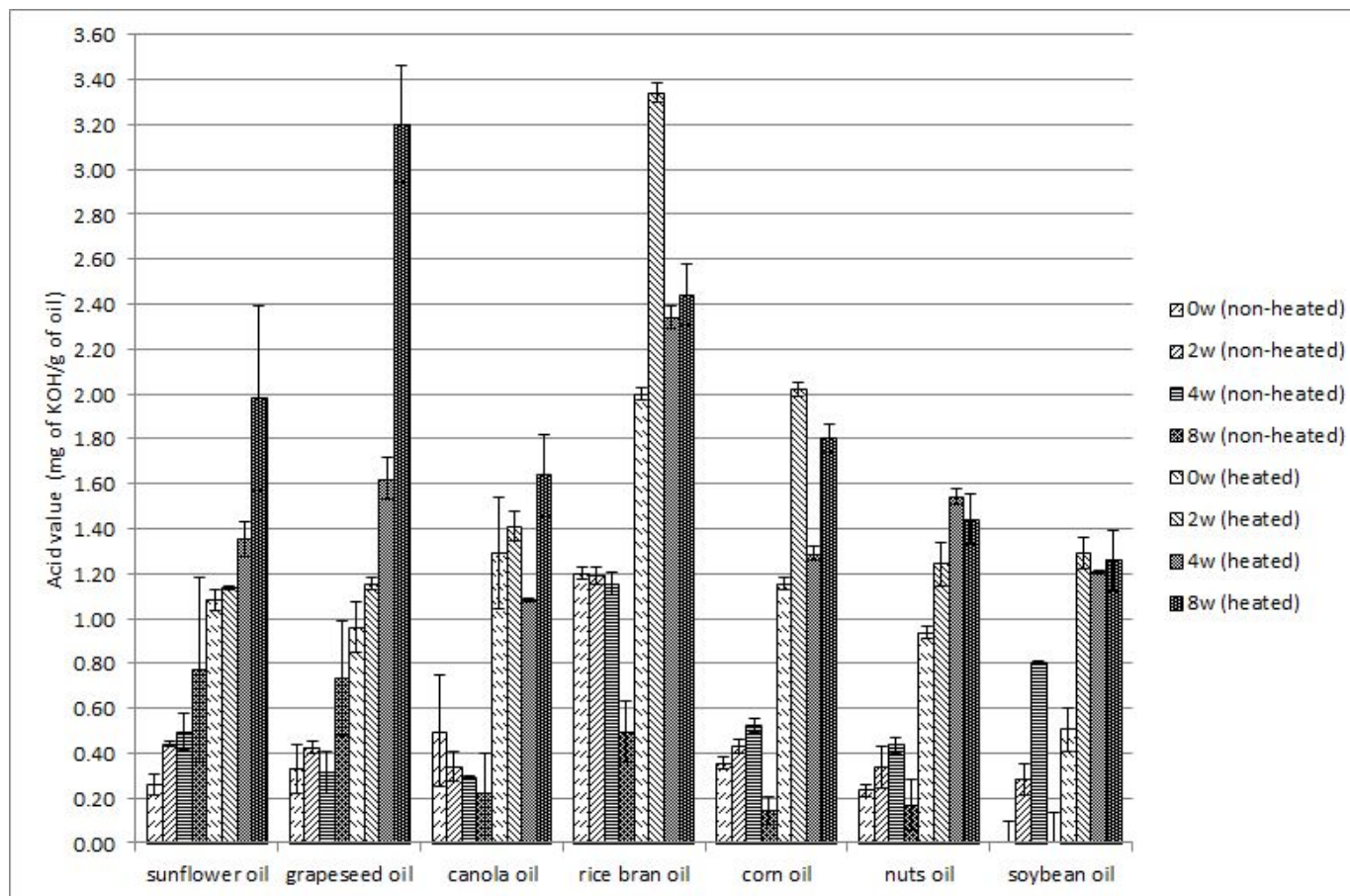


Figure 7 Acid value of vegetable oils according to oxidation period and heating.

4.3. 유지의 다환방향족탄화수소 분석

4.3.1. 분석법 검증

4.3.1.1. 직선성 (Linearity)

농도비 0.05~4에서 검정곡선을 작성한 결과, Figure 8과 같은 검정곡선을 얻을 수 있었다. 그 결과 모든 PAHs에 대하여 상관계수 R^2 이 0.99이상으로 직선성을 나타냈다.

4.3.1.2. 정확도(Accuracy) 및 회수율(Recovery)

표준용액 첨가법으로 PAHs 회수율을 계산하여 Association of Official Analytical Chemists (Horwitz, W. 2002)와 Codex(Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission, 1993)에서 제시한 분석대상 농도에 따른 회수율 범위를 기준으로 정확도를 검증하였다. 이때, 내부표준물질을 이용하여 값을 보정하였고, 그 결과 Table 9과 같이 2가지 농도에서 모든 PAHs의 회수율이 해당 기준 범위 내에 포함되는 것을 확인할 수 있었다.

4.3.1.3. 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

검출한계와 정량한계는 소수점 아래 셋째 자리에서 반올림하여 소수점 아래 둘째 자리까지 나타내었다. 계산한 결과 Table 10과 같은 값을 얻었다.

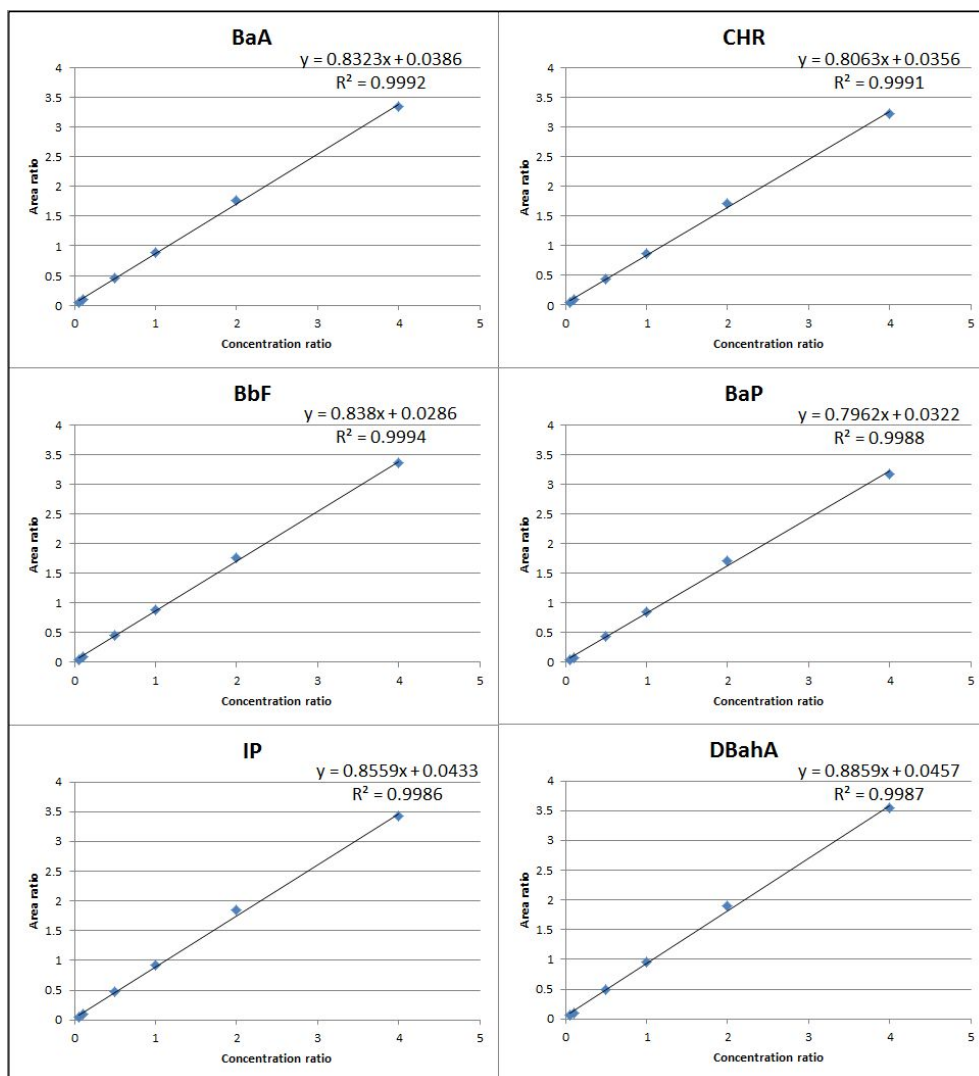


Figure 8 Calibration curves of six PAHs with internal standards

Table 9 Recoveries of the six PAHs spiked at two levels in 2 matrix. (Unit: %)

Matrix	Conc. ($\mu\text{g/kg}$)	No. sample	BaA	CHR	BbFA	BaP	IP	DBahA	Acceptable range	
									AOAC	Codex
Oil	5	5	80	100	75	119	73	88	70–125	60–120
	20	5	86	83	76	108	76	86	75–120	70–120
Filter	5	5	108	109	118	107	76	71	70–125	60–120
	20	5	103	103	111	105	116	116	75–120	70–120

Table 10 Limit of detection(LOD) and limit of quantitation(LOQ) of six PAHs in 2 matrix (Unit: $\mu\text{g/kg}$ sample)

Matrix		BaA	CHR	BbFA	BaP	IP	DBahA
Oil	LOD	0.12	0.08	0.08	0.21	0.33	0.36
	LOQ	0.36	0.25	0.23	0.63	1.00	1.07
Filter	LOD	0.04	0.03	0.03	0.08	0.13	0.13
	LOQ	0.15	0.10	0.10	0.26	0.42	0.45

4.3.2. 식용유지의 다환방향족탄화수소 분석 결과

유지의 산화 및 가열에 따른 PAHs는 oil와 filter(fume) 각각 따로 분석하였는데, oil의 PAHs 검출량은 Table 11에, fume의 PAHs 검출량은 Table 12에 나타내었다.

먼저 유지에서 PAHs는 가열 전에 CHR이 일부 기름에서 검출된 것을 제외하고, 거의 대부분 검출되지 않았다. 그러나 가열 후에는 대부분의 기름에서 BaA와 DBahA가 검출되었다.

반면 fume에서는 4주 산화된 기름을 가열했을 때는 포도씨유를 제외한 모든 기름에서 PAHs가 검출되었음을 확인하였지만, 거의 대부분 PAHs가 검출되지 않았다. 이는 Shuguang, L. et al. (1994)에서 대두유를 265℃에서 가열했을 때와 Chiang, T. A. et al. (1997)에서 대두유를 250℃에서 30분 가열했을 때, 그리고 Chen B. H. et al. (2001)에서 대두유, 해바라기유, 카놀라유를 220℃에서 2시간 가열했을 때 모두 fume에서 다량의 PAHs를 검출한 것과 비교된다. 이는 fume 포집 방법이나 분석기기의 차이 및 가열 온도 등과 관련이 있는 것으로 보인다.

Shuguang, L. et al. (1994)은 oil의 20-30cm 위에 glass filter paper를 장착한 inhalable dust sampler를 설치하여 13-14 L/min의 속도로 2-4시간가량 fume을 포집하였고, oil의 50cm 위에 glass fiber filter paper를 장착한 sampling pump를 설치하여 2L/min의 속도로 fume을 포집하였다. Chen B. H. et al.은 rancimat oil stability analyzer를 사용하였다. 본 연구에서는 sampler 기기를 사용하지 않았으며, vial의 뚜껑 안쪽에 PTFE filter paper를 장착하고 vial을 밀봉한 채로 fume을 포집하여 외부환경으로부터의 PAHs 유입을 막고자 하였다. PAHs 분석을 위한 분석기기는 Shuguang, L. et al. (1994)과 Chiang, T. A. et al. (1997)에서 각각 thin-layer chromatography with fluorescence scanning densitometer와 high performance liquid chromatography with fluorescence detector를 사용하였는데,

Chen, B. H. et al. (2001)과 본 연구에서는 GC/MS SIM analysis를 사용하여 보다 정확한 PAHs의 검출이 가능하게 하였다. 그리고 일상에서 기름 조리 시 170~200℃ 범위에서 가열하는 것을 고려했을 때, 본 연구에서 사용한 가열 조건인 200℃가 실제 식용유지 가열 결과에 더 적합할 것으로 보인다.

Table 11 Occurrence of six PAHs in oils according to the oxidation period and heating at 200℃ for 6hrs. (unit: $\mu\text{g/kg}$ sample)

Oils	Oxidation period	Heating	BaA	CHR	BbFA	BaP	IP	DBahA
Sunflower oil	0w	non-heated	ND ^a	ND	ND	trace ^b	ND	ND
	0w	heated	ND	ND	ND	trace	ND	3.23 ± 0.31
	2w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	3.70 ± 0.23
	4w	heated	ND	ND	ND	trace	ND	3.45 ± 0.29
	8w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	3.42 ± 0.42
Grape-seed oil	0w	non-heated	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	0w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	4w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	8w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Canola oil	0w	non-heated	trace	ND	ND	ND	ND	ND
	0w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	5.02 ± 0.10
	2w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	2.24 ± 0.27
	4w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	2.76 ± 0.35
	8w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	2.51 ± 0.10
Rice bran oil	0w	non-heated	ND	0.57 ± 0.02	ND	ND	ND	1.02 ± 0.04
	0w	heated	trace	0.31 ± 0.27	ND	ND	ND	3.39 ± 2.45
	2w	heated	ND	ND	0.28 ± 0.50	ND	ND	3.87 ± 0.38
	4w	heated	0.70 ± 1.22	ND	ND	ND	ND	1.70 ± 0.35
	8w	heated	0.55 ± 0.60	ND	ND	ND	ND	2.01 ± 0.21

(Continued)

Oils	Oxidation period	Heating	BaA	CHR	BbFA	BaP	IP	DBahA
Corn oil	0w	non-heated	ND	0.28±0.03	ND	ND	ND	ND
	0w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	7.31±0.94
	2w	heated	1.99±0.38	ND	ND	ND	ND	6.74±1.03
	4w	heated	0.62±1.07	ND	ND	ND	ND	4.22±0.51
	8w	heated	1.54±0.31	ND	ND	ND	ND	6.87±0.15
Nuts oil	0w	non-heated	ND	trace	ND	ND	ND	ND
	0w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	3.15±0.34
	2w	heated	0.48±0.11	ND	ND	ND	ND	1.41±0.11
	4w	heated	1.35±0.36	ND	ND	ND	ND	3.68±0.23
	8w	heated	1.92±0.03	ND	ND	ND	ND	3.10±0.14
Soybean oil	0w	non-heated	trace	0.58±0.12	ND	ND	ND	ND
	0w	heated	4.08±0.27	ND	ND	ND	ND	8.39±0.94
	2w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	9.58±1.17
	4w	heated	1.77±0.96	trace	ND	ND	ND	6.52±1.20
	8w	heated	2.29±0.17	ND	ND	ND	ND	3.73±0.16

All results are expressed as mean±SD for three replicates

^a ND: Not detected, ^b trace < LOQ

Table 12 Occurrence of six PAHs in fume after heating according to the oxidation period at 200°C for 6hrs. (unit: $\mu\text{g/kg}$ sample)

Oils	Oxidation period	Heating	BaA	CHR	BbFA	BaP	IP	DBahA
Sunflower oil	0w	heated	trace ^a	ND ^b	ND	ND	ND	ND
	2w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	4w	heated	ND	ND	ND	trace	ND	1.28 ± 0.08
	8w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Grape-seed oil	0w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	4w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	8w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Canola oil	0w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	4w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	0.74 ± 0.09
	8w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Rice bran oil	0w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	4w	heated	ND	0.14 ± 0.04	ND	ND	ND	ND
	8w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	ND

(Continued)

Oils	Oxidation period	Heating	BaA	CHR	BbFA	BaP	IP	DBahA
Corn oil	0w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	4w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	3.14±0.06
	8w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Nuts oil	0w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2w	heated	ND	ND	trace	ND	ND	ND
	4w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	0.89±0.28
	8w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Soybean oil	0w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	4w	heated	trace	ND	ND	ND	ND	3.09±0.16
	8w	heated	ND	ND	ND	ND	ND	ND

All results are expressed as mean±SD for three replicates

^a trace < LOQ, ^b ND: Not detected

4.3.3. Triglyceride 가열 후 다환방향족탄화수소 분석 결과

순수한 triglyceride를 가열한 후 PAHs 생성량을 분석한 결과, 거의 대부분 PAHs가 검출되지 않았다. 이는 Chen B. H. et al. (2001)에서 methyl fatty acid를 가열하여 불포화도 증가에 따른 다량의 PAHs를 검출한 것과 대비되는 결과이다. 이는 triglyceride와 methyl fatty acid 간 구조 차이에 기인한 것으로 사료된다. 그리고 식용유지는 거의 대부분 triglyceride형태로 존재하기 때문에 실제 식용유지를 가열한 결과를 보기 위해서는 본 연구에 사용된 triglyceride형태의 model lipids가 더 적합할 것으로 생각된다. 그러나 가열 후 PAHs가 거의 검출되지 않아, 불포화도에 따른 PAHs 생성량의 변화는 확인할 수 없었다.

Table 13 Occurrence of six PAHs in synthetic triglycerides after heating (unit: $\mu\text{g}/\text{kg}$ sample)

Compounds	Matrix	BaA	CHR	BbF	BaP	IP	DBahA
Glyceryl tripalmitate	fume	ND ^a	ND	ND	ND	ND	ND
	oil	ND	ND	ND	ND	0.90 ± 1.57	ND
Glyceryl tristearate	fume	ND	0.88 ± 1.53	ND	ND	ND	ND
	oil	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Glyceryl trioleate	fume	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	oil	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Glyceryl trilinoleate	fume	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	oil	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^a ND: Not detected

4.4. 유지 산패도가 다환방향족탄화수소 생성에 미치는 영향

4.4.1. 유지 산패 지표의 적절성 평가

유지의 불포화도가 높을수록 유지의 산화가 쉽게 일어난다고 알려져 있다(Labuza, T. P. et al. 1971). 따라서 유지의 불포화도를 나타내는 요오드가와 각 산패 지표의 산화기간에 따른 산패도 기울기의 상관관계를 확인하였다. 그 결과, 유지의 불포화도는 산화기간에 따른 과산화물가, p-anisidine, 산가의 기울기와 유의적으로 양의 선형관계를 보이는 것을 확인할 수 있었다(Table 14).

유지의 불포화도와 TBA가는 유의적인 선형관계를 보이지 않았는데, 이는 유지의 불포화도가 높을수록 유지의 산화가 쉽게 일어난다는 기존 원칙(Labuza, T. P. et al. 1971)와 대비되는 결과이다. 또한 TBA가는 다른 산패 지표와의 상관분석을 실시해도 유의한 선형관계를 보이지 않았다. 이 결과는 TBA가의 특성으로 유추해볼 수 있는데, malondialdehyde가 아미노산과 같은 다른 화합물과 복합체를 형성하면서 경쟁이 발생하여 TBA가가 다른 산화지표와 다르게 측정되는 경우가 있으며, 이러한 경쟁반응은 수분이 없는 환경에서 더 활발하게 일어날 것으로 예측된다고 알려져 있다(Gray, J. 1978). 그리고 thibarbituric acid는 malondialdehyde 뿐만 아니라 다른 산화생성물 또는 기타 화합물들과도 폭넓게 반응하기 때문에 반응의 특수성을 보장하기 어렵다고 알려져 있다(Wasowicz, W. et al. 1983). 따라서 식용유지 내 존재하는 malondialdehyde의 정확한 측정이 되지 않아 다른 산패 지표들과 일치하지 않는 분석결과를 나타낸 것으로 보인다. 즉 본 연구에서 TBA가는 산패지표로써 적절한 역할을 하지 못하는 것을 알 수 있다.

Table 14 Correlation coefficient between unsaturation of oils and rancidity slope of oils according to oxidation periods (N=21)

	Slope			
	Peroxide value	TBA value	p-Anisidine value	Acid value
Iodine value	.741**	.038	.466*	.691**

** p<0.01 * p<0.05

4.4.2. 유지의 산패도가 다환방향족탄화수소 생성량에 미치는 영향

유지의 가열 전 각 산패 지표와 oil, fume, oil+fume 각각의 PAHs 생성량에 대해 상관관계를 분석하였다. 여기서 oil+fume은 oil과 fume에서 검출된 PAHs의 합을 말한다. 그리고 분석에 사용된 PAHs 중 통계적으로 적합하지 않은 검출수를 나타낸 PAHs는 분석에서 제외하였다 (Table 11, Table 12 참고). 그 결과 (Table 15), 과산화물가는 oil과 oil+fume의 DBahA, $\Sigma 6\text{PAHs}$ (PAHs 6종의 합)과 유의적으로 음의 선형관계를 나타냈다. 그리고 p-anisidine value는 oil, fume, oil+fume의 DBahA, $\Sigma 6\text{PAHs}$ 와 유의적으로 음의 선형관계를 나타냈다. 이러한 유의적인 상관관계는 가열 전 유지의 산화물 함량이 유지 가열 후 PAHs 생성량과 밀접한 관련이 있음을 의미한다. 반면 TBA value는 모든 PAHs와 oil 또는 fume, oil+fume에서 모두 유의성이 있는 상관관계를 보이지 않았다. TBA가는 앞서 설명한 것처럼, 본 연구에 적절한 산패 지표로 보기 어렵기 때문에 PAHs 생성과의 상관관계가 다른 산패 지표와 다른 결과를 나타낸 것으로 보인다.

그리고 산가는 유지 가열 후 oil의 BaA, $\Sigma 6\text{PAHs}$ 과 유의적으로 음의 선형관계를 보였으며, 또한 oil+fume의 BaA와 유의적으로 음의 선형관계를 보였다. 즉, 유지의 산패도와 PAHs 생성량은 유의성을 나타낸 모든 경우에서 음의 선형관계를 나타냈다.

상관분석에서 유의성을 나타낸 경우에 한해 회귀분석한 결과, 모든 경우에서 유의확률이 0.05 이하로 나타나 산패도가 PAHs 생성에 유의한 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 선형회귀식을 도출했을 때는 R^2 가 낮아 PAHs 생성량을 예측할만한 모델을 얻지는 못하였다. oil, fume, oil+fume 각각의 $\Sigma 6\text{PAHs}$ 와 유의적인 결과를 나타낸 산가, 과산화물가, 아니시딘가의 회귀분석 결과를 Figure 9에 예시로 나타내었다.

이러한 통계분석 결과를 통해, 유지의 산패가 일어남에 따라 유지 가열 후 PAHs 생성량이 감소하는 것을 알 수 있었다. 즉 산패 정도가 유지의 품질지표임을 고려할 때, 유지의 품질이 저하될수록 가열 후 PAHs 생성이 감소하는 결과를 얻게 되었다.

이러한 결과가 나타난 원인은 PAHs 생성 메커니즘을 통해서 유추해볼 수 있다. PAHs는 유기 화합물이 높은 온도에서 PAHs 생성의 전구체가 되는 unsaturated aliphatic radicals 등으로 분해된 후, 이 화합물들이 라디칼 연쇄반응에 의해 고리형으로 축합되면서 생성된다(Lee, M. L. et al. 1981). 그러나 유지 산패로 인해 생성된 화합물인 free fatty acids, hydroperoxides, aldehydes 등에는 산소원자가 포함된다. 따라서 산패가 진행된 유지가 열분해되어 생긴 fragments에 PAHs 분자의 구성성분이 아닌 산소가 포함되면서, PAHs 생성에 필요한 전구체의 생성이 어려워졌을 가능성이 있다. 또는 산패로 인해 생성된 화합물들이 PAHs 생성 과정의 라디칼 연쇄반응에 참여함으로써 PAHs 생성 메커니즘을 방해하여 PAHs 생성이 줄어들었을 수 있다.

그러나 통계분석 결과에 따르면, 본 연구에서 측정한 유지 산패 지표들은 PAHs 생성량에 영향을 미치는 유일한 요인은 아닌 것으로 사료된다. 따라서 PAHs 생성량에 영향을 미칠 수 있는 다른 요인들 다음 장에서 추가적으로 논의하였다.

Table 15 Correlation coefficient between lipid rancidity before heating and PAHs in heated oils according to the oxidation periods (N=84)

	Oil			Fume		Oil + Fume		
	BaA	DBahA	Σ 6PAHs	DBahA	Σ 6PAHs	BaA	DBahA	Σ 6PAHs
Peroxide value	-.014	-.317**	-.266*	-.061	-.064	-.015	-.305**	-.262*
TBA value	.065	-.004	.012	-.007	-.008	.066	-.006	.009
p-Anisidine value	-.179	-.466**	-.423**	-.238*	-.230*	-.183	-.492**	-.449**
Acid value	-.327**	-.170	-.228*	.153	.167	-.322**	-.108	-.169

** p<0.01 * p<0.05

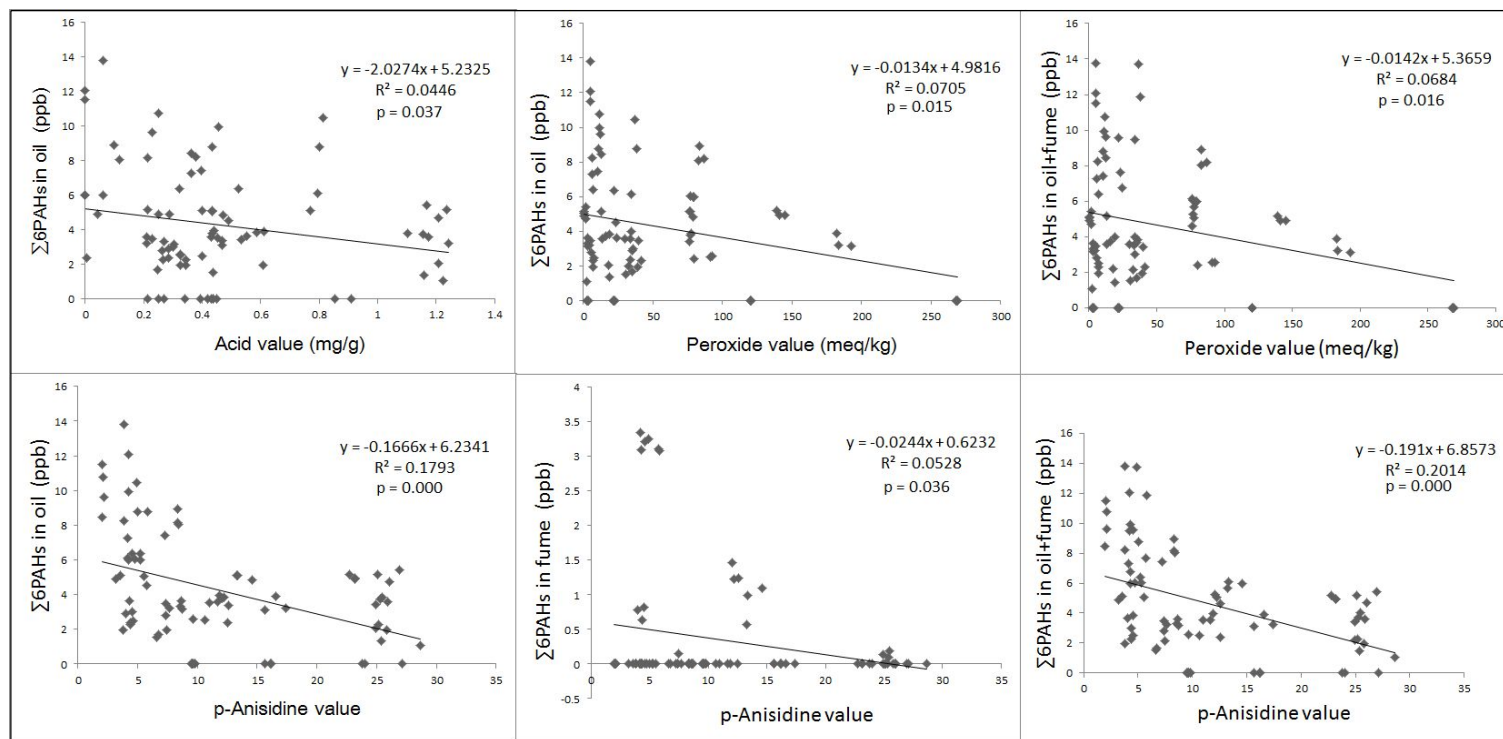


Figure 9 Regression assessments whether lipid rancidity indices account for the formation of six PAHs in oil, fume and oil+fume.

4.4.3. 유지의 산패도 외 다환방향족탄화수소 생성에 영향을 미칠 수 있는 요인

기름 종류별로 oil과 fume에서 생성된 6 PAHs 생성량의 차이를 분석하여 Table 16과 같은 결과를 얻었다. 옥수수유와 대두유는 다른 기름들에 비해 PAHs 생성량이 유의적으로 높게 나타났는데, 제조사의 테스트 자료에 따르면(CheilJedang Co. 2016), 본 연구에 사용한 식용유지 7종은 200–240℃에서 발연점을 가지며, 대두유(약 200℃), 옥수수유, 견과유, 포도씨유, 카놀라유, 쌀눈유, 해바라기유(약 240℃)의 순서대로 발연점이 낮았다. 즉, 옥수수유와 대두유는 다른 기름들에 비해 발연점이 낮았고 본 연구에서 사용한 가열 온도와 비슷한 수준의 발연점을 갖는 것을 확인하였다. 이를 통해 유지의 발연점이 유지 가열 시 PAHs 생성에 영향을 미칠 수 있음을 알 수 있었다.

또한 유지 산화로 인해 생성된 breakdown products 중 산소를 포함하지 않는 hydrocarbons(Frankel, E. N. 1983) 등이 유지 가열 후 PAHs 생성에 기여했을 가능성을 고려할 수 있다. hydrocarbons은 PAHs 전구체 생성에 기여할 수 있을 뿐 아니라, 산소를 포함한 같은 구조의 화합물보다 발연점이 낮다고 알려져 있기 때문에(Hunt, R.A. 1953 재인용), 유지의 산패 지표로써 hydrocarbons을 측정하는 등의 추가적인 후속 연구가 필요할 것으로 보인다.

Table 16 Occurrence of PAHs in each oils (unit: $\mu\text{g/kg}$ sample)

Oils	$\Sigma 6\text{PAHs}$ in Oil+Fume ^a
Sunflower oil	3.87 ± 0.74 a ^b
Grape seed oil	0.00 ± 0.00 b
Canola oil	3.32 ± 1.16 a
Rice bran oil	3.26 ± 1.45 a
Corn oil	8.10 ± 1.08 c
Nuts oil	3.97 ± 1.69 a
Soybean oil	9.94 ± 2.85 c

^a All results are expressed as mean \pm standard deviation for N=12.

^b Values with a column followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$)

5. 요약 및 결론

유지의 가열 전 산패도가 유지 가열 후 PAHs 생성에 어떤 영향을 미치는지 알아보았다. 가열된 유지의 PAHs 분석을 위한 전처리 법은 본 연구에서 처음 시도되었고 기존의 실험법을 시간과 비용 측면에서 간소화할 수 있었다. 산패도에 따른 PAHs 생성량의 통계분석 결과 산패 지표 총 4가지 중, 과산화물가와 p-anisidine value, 산가가 높아짐에 따라 PAHs 생성량이 낮아지는 결과를 나타냈다. 그러나 TBA가는 PAHs 생성량과 유의적인 상관관계를 나타내지 않았는데, 이는 TBA test가 본 연구에서 적절한 산패 지표로 작용하지 못함이 그 원인이라고 사료된다.

즉, 산패 정도가 유지의 품질지표임을 고려할 때, 유지의 품질이 저하될수록 가열 후 PAHs 생성이 감소하는 결과를 얻게 되었다. PAHs 생성 메커니즘을 통해서 이러한 결과가 나타난 원인을 유추해 본 결과, 유지의 산패로 인해 생성된 화합물들이 PAHs의 전구체 생성을 감소시키거나 라디칼 연쇄 축합반응을 방해했을 가능성이 있다. PAHs는 유기 화합물이 높은 온도에서 PAHs 생성의 전구체가 되는 unsaturated aliphatic radicals 등으로 분해된 후, 이 화합물들이 라디칼 연쇄반응에 의해 고리형으로 축합되면서 생성된다(Lee, M. L. et al. 1981). 그러나 유지 산패로 인해 생성된 화합물인 free fatty acids, hydroperoxides, aldehydes 등은 모두 산소원자를 포함하고 있어 PAHs 생성의 직접적인 전구체로 볼 수 없다. 실제 PAHs 생성에 참여하는 라디칼들은 산화반응과 무관하지는 않으나, 산화에서 시작된 라디칼 반응이 진행되며 생성된 탄소와 수소만으로 이루어진 지질 분해산물일 가능성이 크다. 따라서 이 연구에서 측정한 산패지표가 PAHs의 전구체를 직접적으로 대표하지 못했을 것으로 사료된다.

그러나 이러한 산패 지표들이 PAHs 생성에 영향을 미치는 유일한 요인은 아닌 것으로 사료된다. 이에 대해 유지 종류별로 PAHs 생성량의 차이를 확인한 결과, 유지 발연점이 낮을 때 PAHs 생성량이 높은 것을 알 수 있었다. 또한 유지 산화로 인해 생성된 breakdown products 중

산소를 포함하지 않는 hydrocarbons 등이 유지 가열 후 PAHs 생성에 기여했을 가능성을 고려할 수 있다. hydrocarbons은 PAHs 전구체 생성에 기여할 수 있을 뿐 아니라, 산소를 포함한 같은 구조의 화합물보다 발연점이 낮다고 알려져 있기 때문에(Hunt, R.A. 1953 재인용), 유지의 산패 지표로써 hydrocarbons을 측정하는 등의 추가적인 후속 연구가 필요할 것으로 보인다.

그리고 식용유지 내 주로 존재하는 fatty acids 4종의 순수한 triglyceride 형태를 가열했을 때에 PAHs가 거의 검출되지 않아 불포화도에 따른 PAHs 생성량의 차이는 확인할 수 없었다.

참 고 문 헌

Alomirah, H., et al. (2011). "Concentrations and dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from grilled and smoked foods." Food Control 22(12): 2028–2035.

Amin S., et al. (1985a). "Mutagenicity and tumor-initiating activity of methylated benzo[b]fluoranthenes. Carcinogenesis 6:1023–1025.

Amin S., et al. (1985b). "Mutagenicity and tumor initiating activity of methylated benzo[k]fluoranthenes. Cancer Letters 26:343–347.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). (1995) "Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs)." U.S. Department of health and human services, public heath service.

Bartosek, I., et al. (1984). "Comparative kinetics of oral benz[a]anthracene, chrysene and triphenylene in rats: Study with hydrocarbon mixtures." Toxicology Letters 23:333–339.

Berasategi, I., et al. (2012). "Stability of avocado oil during heating: Comparative study to olive oil." Food Chemistry 132(1): 439–446.

Brewer, M. and S. Wu (1993). "Display, packaging, and meat block location effects on color and lipid oxidation of frozen lean ground beef." Journal of food Science 58(6): 1219–1236.

Bui, P. H., et al. (2009). "Fatty acid hydroperoxides support cytochrome P450 2S1-mediated bioactivation of benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol" Molecular Pharmacology 76(5): 1044–1052.

Chen B. H., et al. (2001). "Formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Smoke from Heated Model Lipids and Food Lipids." Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49(11):5238–43.

Chen Y. C., et al. (2003). "Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Fumes from Fried Chicken Legs." Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51(14):4162–7.

CheilJedang Co. (recent date: 2016. June. 17.) flash points of oils, URL(<http://www.beksul.net/product/allAboutOil8.do>).

Chiang, T. A., et al. (1997). "Mutagenicity and polycyclic aromatic hydrocarbon content of fumes from heated cooking oils produced in Taiwan." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **381**(2): 157–161.

Choe, E. and D. B. Min (2006). "Mechanisms and factors for edible oil oxidation." Comprehensive reviews in food science and food safety **5**(4): 169–186.

Dabestani, R. and I. N. Ivanov (1999). "A compilation of physical, spectroscopic and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons." Photochemistry and photobiology 70(1): 10–34.

EFSA(European Food Safety Authority). (2008a). "A Report from the Unit of Data Collection and Exposure on a Request from the European commission."

EFSA(European Food Safety Authority). (2008b). Polycyclic aromatic hydrocarbons in food scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. The EFSA Journal, 724, 1–114.

Esteve–Turrillas, F. A., et al. (2005). "Determination of pyrethroid insecticide residues in vegetable oils by using combined solid–phases extraction and tandem mass spectrometry detection." Analytica Chimica Acta 553(1–2): 50–57.

European Commission (2002). "Opinion of the scientific committee on food in te risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food" , SCF/CS/CNTM/PAH/29 final, 4 December.

European Commission (2011). "Regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs." Commission Regulation, No. 835.

Farhadian, A., et al. (2010). "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meat." Food Control 21(5): 606–610.

Frankel, E. N. (1983). "Volatile lipid oxidation products." Progress in lipid research 22(1): 1–33.

Freeman, I. P. (2000). Margarine and Shortenings. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley–VCH Verlag GmbH

& Co. KGaA.

FSA(Food Standards Agency). (2012). Polycyclic aromatic hydrocarbons in cereal products, vegetables, vegetable products and traditionally smoked foods.

FSANZ(Food Standards Australia New Zealand). (2004). "Survey of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons(PAH) in Australian Foods_Dietary Exposure Assessment and Risk Characterisation."

Gao, Y. T., et al. (1987). "Lung cancer among Chinese women." International Journal of Cancer, 40(5): 604–609.

Gerde, P., et al. (1991). "The retention of polycyclic aromatic hydrocarbons in the bronchial airways and in the alveolar region: A theoretical comparison. Toxicology Applied Pharmacology 107(2): 239–252.

Gray, J. (1978). "Measurement of lipid oxidation: a review." Journal of the American Oil Chemists' Society 55(6): 539–546.

Guillen–Sans, R. and M. Guzman–Chozas (1998). "The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: a review." Critical reviews in food science and nutrition 38(4): 315–350.

Hopia, A., et al. (1986). "Margarines, butter and vegetable oils as sources of polycyclic aromatic hydrocarbons." Journal of the American Oil Chemists' Society 63(7): 889–893.

Horwitz, W. (2002). AOAC guidelines for single laboratory

validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. AOAC International, pp. 12–19.

Hunt, R. A. (1953). "Relation of smoke point to molecular structure." Industrial & Engineering Chemistry **45**(3): 602–606.

IARC (1983). IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals in humans, Polynuclear aromatic compounds, Part.1, Chemical, Environmental and Experimental Data, vol.32, Lyon.

Ilwon, S., et al. (2009). "Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sesame Oils Derived from Sesame Seeds of Different Places of Origins." Korean Journal of Food Science and Technology **41**(1): 21–26.

In Sook K., et al. (1993). "A Study on the Occurrence of Benzo(a)pyrene in Fats and Oils by Heat Treatment(I)." The Journal of Korean Society of Food & Cookery Science. **9**(4):323–8.

In Sook K., et al. (1994). "A Study on the Occurrence of Benzo(a)pyrene in Fats and Oils by Heat Treatment(3)." The Journal of Korean Society of Food & Cookery Science **10**(3):301–307.

Irwin, J., et al. (2004). "Measuring lipid oxidation." Understanding and Measuring Shelf life of Food: 289–316.

Jernia, D. M., et al. (1980). in Carcinogenesis: Fundamental mechanisms and Environmental Effects, eds. Pull-man, B., Ts' o,

P.O.P. & Gelboin, H.V. (D. reidel, Dordrecht, Holland), pp. 1–12.

Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission. (1993). Codex Alimentarius: Residues of Veterinary Drugs in Foods. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Kawamura, Y., et al. (1988). "The effect of various foods on the intestinal absorption of benzo-a-pyrene in rats. Journal of Food Hygienic Society of Japan 29(1):21–25.

Kolarovič, L. and H. Traitler (1982). "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils by caffeine complexation and glass capillary gas chromatography." Journal of Chromatography A **237**(2): 263–272

Kramer, J. K. (2012). High & low erucic acid rapeseed oils, Academic Press.

Kyriakidis, N. B. and T. Katsiloulis (2000). "Calculation of iodine value from measurements of fatty acid methyl esters of some oils: comparison with the relevant American oil chemists society method." Journal of the American Oil Chemists' Society **77**(12): 1235–1238.

Labuza, T. P. and L. R. Dugan (1971). "Kinetics of lipid oxidation in foods." C R C Critical Reviews in Food Technology **2**(3): 355–405.

Lee, M.L., et al. (1981). in Analytical Chemistry of polycyclic aromatic compounds. New York: Academic Press.

Luck, E. and G.W. von Rymon Lipinski (2000). Foods, 3. Food Additives. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley–VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Lutterodt, H., et al. (2011). “Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours.” Food Chemistry 128:391–399

Mehlenbacher, V.C., et al. (2009). Official Methods and Recommended Practices of the AOCS, AOCS.

MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). (2012). “Study on monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in food products”

Moret, S. and L. S. Conte (2000). "Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical methods." Journal of Chromatography A 882(1): 245–253.

Perkins, E. G., et al.(1967). Formation of non-volatile decomposition products in heated fats and oils. Food technology, INST FOOD TECHNOLOGISTS SUITE 300 221 N LASALLE ST, CHICAGO, IL 60601–1291.

Pleil, J. D., et al. (2004). “Assaying particle-bound polycyclic aromatic hydrocarbons from archived PM_{2.5} filters.” Journal of Chromatography A 1033: 9–17

Przybylski, R. and N. M. Eskin (1995). Methods to measure volatile compounds and the flavor significance of volatile

compounds. Methods to assess quality and stability of oils and fat-containing foods: 107–133.

Purcaro G., et al. (2006). "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Frying Oils and Snacks." Journal of Food Protection, 69(1): 199–204.

Shuguang, L., et al. (1994). "Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Cooking Oil Fumes." Archives of Environmental Health: An International Journal 49(2): 119–122.

Skiera, C., et al. (2014). "Determination of free fatty acids in pharmaceutical lipids by ¹H NMR and comparison with the classical acid value." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 93: 43–50.

Speer K., et al. (1990). "Determination and Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Native Vegetable oils, Smoked Fish Products, Mussels and Oysters, and Bream from the River Elbe" , Journal of High Resolution Chromatography, 13, 104–111.

Thomas, A. (2000). Fats and Fatty Oils. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley–VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Vo–Dinh, T., et al. (1998). "Monitoring and characterization of polyaromatic compounds in the environment." Talanta 47(4): 943–969.

Wasowicz, W., et al. (1983). "Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid–reactive substances in serum:

importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage." Clinical Chemistry 39(12): 2522–2526.

Wood, A. W., et al. (1982). "Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by naturally occurring plant phenols: exceptional activity of ellagic acid." Proceedings of the National Academy of Sciences 79(18): 5513–5517.

Wu-Williams, A. H., et al. (1990). Lung cancer among women in north-east China. Brit. J. Cancer 62(6): 982–987.

Zambiasi, R. C. (2007). "Fatty acid composition of vegetable oils and fats." B. CEPPA, Curitiba, 25(1):111–120.

Abstract

The Influence of lipid rancidity on the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons in heated oils and their fumes

Chan-Mi Kim

Food and Nutrition

The Graduate School

Seoul National University

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are important cooking related contaminants. Because of their high lipophilicity, PAHs generated during cooking tends to be found in oils and lipid matrices of cooked food. In addition, increased lung cancer observed among Chinese woman has been attributed to the exposure to oil fumes, which might be associated with the presence of PAHs in the fumes of heated oils. Since heating oils are the frequently used food preparation method, it is necessary to analyze factors that may affect to the formation of PAHs in heated oils. The objective of this study was to investigate whether lipid rancidity of cooking oils may affect the formation of PAHs upon heating, either in oils and their fume. Various vegetable oils were experimentally oxidized

under the exposure of UV radiation, air and Fe catalyst for 2, 4 and 8 weeks. Oxidized vegetable oils were heated at 200°C for 6hrs in vials with screw cap. The fume was collected in archived filters (PTFE) which were located inside the screw cap, without the need for installing specialized air sampler. PAHs, including Benzo[*a*]anthracene (BaA), Chrysene (CHR), Benzo[*b*]fluoranthene (BbF), Benzo[*a*]pyrene (BaP), Indeno[1,2,3-*c,d*]pyrene (IP), Dibenz[*a,h*]anthracene (DBahP) were extracted from the oils and filters (fumes) by the different sample preparation methods. Synthetic triglycerides consisted with three same fatty acids were heated and analyzed with same protocol. PAHs in both the oils and the fume were quantified by GC/MS. The result showed that lipid rancidity indices, including peroxide value, p-anisidine value, acid value, are negatively correlated with the formation of PAHs. The regression analysis also confirmed a significant trend confirming that lipid rancidity parameters accounted for the formation of PAHs. However, it was not possible to construct a linear model to predict the PAHs formation because of the low R square value. In the present study, when the levels of oxidative markers increased, the formation of PAHs decreased. The formation of PAHs has been shown to be related to free radical chain lengthening reactions, such as the cyclization of unsaturated aliphatic radicals. Lipid oxidation products which have oxygen atoms in their molecules could affect free radical chain lengthening reactions or the formation of precursors of PAH generation which are aliphatic compounds. However, these lipid rancidity markers did not seem to be the only factors that could affect the formation of PAHs. We found that oils which had lower smoking point showed higher

occurrence of PAHs than others. Also, oxygen-free hydrocarbons which are one of the breakdown products of lipid oxidation could be considered another factor that could affect the formation of PAHs. Since hydrocarbons had smoke points as low as or lower than the corresponding compounds of oxygen as well as they could contribute the formation of PAH precursors, further research is needed to shed light on the effect of hydrocarbons to the formation of PAHs. We could not verify the influence of unsaturation of oils on the formation of PAHs because only a few PAHs were detected in the synthetic triglycerides of both the oils and fumes after heating.

keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons, rancidity, oil, fume, triglyceride, analytical method.

Student Number: 2014-22888